

ODILEI ROGERIO PRADO

**OCORRÊNCIA DE *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* e *E. mitis* EM
FRANGOS DE CORTE NA REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Patologia Veterinária,
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Setor de
Ciências Agrárias, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Waldir Hamann
Co-orientador: Dr. Carlos Alberto
Fagonde Costa

CURITIBA
2005



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **ODILEI ROGERIO PRADO** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Dissertação, intitulada **“OCORRÊNCIA DE *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* E *E. mitis* EM FRANGOS DE CORTE NA REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato se apresentou muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03 – CEPE considerou o candidato APROVADO concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 24 de outubro de 2005.

Prof. Dr. Waldir Hamann
Presidente/Orientador

Profa. Dra. Rosângela Locatelli Ditttrich
Membro

Dr. Carlos Alberto Fagonde Costa
Membro

*Ao meu filhão Arthur, a minha querida
esposa Alda, aos meus pais José e Sonia, a
minha irmã Lidianne, familiares e amigos, de
coração,*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela minha existência. Obrigado, por mais essa etapa profissional e pessoal concluída.

Ao Prof. Dr. Waldir Hamann, pelo tempo dedicado em orientação e paciência.

Ao Dr. Carlos Alberto Fagonde Costa, pela oportunidade, aprendizado e dedicação durante todo o período experimental.

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização do Mestrado junto ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante todo o curso.

À EMBRAPA Suínos e Aves de Concórdia-SC, pela recepção e acolhimento durante todo o período experimental.

À todas as pessoas do Laboratório de Sanidade da EMBRAPA-CNPQA, pelo carinho e atenção em todos os momentos.

Ao laboratorista Maximino Mezacasa pela ajuda e amizade durante todo o período de coleta do material de campo.

Às bolsistas da EMBRAPA-CNPQA, Andréia Bassani e Nelise Triques, por boa vontade e apoio durante todo processamento do material e pela grande amizade.

À SADIA, pela abertura de seus aviários integrados, e a todos os funcionários que ajudaram de forma direta ou indireta para realização desse trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização profissional e pessoal durante este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. O gênero <i>Eimeria</i>	4
2.2. Morfologia e ciclo evolutivo.....	4
2.3. Descrição de algumas espécies de <i>Eimeria</i>	6
2.4. Identificação das espécies de <i>Eimeria</i>	9
2.5. A técnica de PCR.....	11
2.6. Eletroforese em gel de agarose.....	14
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Local.....	16
3.2. Colheita de fezes.....	16
3.3. Colheita das aves.....	17
3.4. Avaliação dos escores de lesão.....	17
3.5. Colheita e armazenamento de oocistos de <i>Eimeria</i>	18
3.6. Processamento de oocistos de <i>Eimeria</i> para extração de DNA.....	19
3.7. Programa da reação de PCR.....	20
3.8. Eletroforese no gel de agarose.....	22
3.9. Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. Número de oocistos de <i>Eimeria</i> nas fezes.....	25
4.2. Escores de lesão no intestino dos frangos.....	25
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....	26
4.4. Correlações entre número de oocistos, escore de lesão e PCR.....	28
5. CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
APÊNDICE	

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1 PRIMERS USADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	21
TABELA 2 NÚMERO DE OOCISTOS/ML NAS GRANJAS DE FRANGOS DE CORTE DURANTE AS COLETAS NA REGIÃO DE CONCÓRDIA-SC.....	24
TABELA 3 MÉDIA DO ESCORE DE LESÃO NO INTESTINO DOS TRÊS FRANGOS DAS 10 GRANJAS NA REGIÃO DE CONCÓRDIA-SC.....	25
TABELA 4 NÚMERO DE GRANJAS POSITIVAS PARA ESPÉCIES DE EIMERIA (RESULTADO DE TRÊS COLETAS).....	26
TABELA 5 CORRELAÇÕES ENTRE O RESULTADO DO PCR, NÚMERO DE OOCISTOS/ML E OS ESCORES DE LESÃO NO INTESTINO DOS FRANGOS CAUSADOS PELAS ESPÉCIES DE <i>EIMERIA</i>	28
FIGURA 1 REAÇÃO DE PCR EM TRÊS AMOSTRAS (1, 2, 3) DE DIFERENTES CEPAS DE <i>E. ACERVULINA</i> EM GEL DE POLIACRILAMIDA (6,7%): P (PESO MOLECULAR: X 176), 1 (EABP2), 2 (EALP8A) E 3 (EALP8A P12AC1).....	21
FIGURA 2 REAÇÕES POSITIVAS NO PCR EM GEL DE AGAROSE 1,5% DAS GRANJAS 2 E 7 (PRIMEIRA COLETA E AMOSTRA 1).....	26

RESUMO

A coccidiose é uma das doenças mais freqüentes na avicultura industrial mundial. Os agentes causadores dessa enfermidade pertencem ao gênero *Eimeria*, e as espécies que parasitam as aves domésticas são: *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*, sendo as três últimas de maior importância para produção de frangos de corte e monitoradas pela indústria avícola nas granjas através do escore de lesão causada no intestino delgado e ceco das aves. O presente trabalho teve como objetivo diagnosticar a coccidiose através da técnica de PCR e estudar a sua aplicabilidade no diagnóstico da enfermidade na região Oeste de Santa Catarina, Brasil. Foram utilizadas 10 granjas num raio de 20 km do município de Concórdia-SC. O material coletado foi fezes recém eliminadas, obtidas diretamente da cama e 3 frangos colhidos aleatoriamente dos aviários. Os frangos foram abatidos para avaliação do escore de lesão produzido de acordo com as espécies de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. Os oocistos foram colhidos das fezes para posterior processamento e extração do DNA, e utilização desse material na técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Os resultados da contagem dos oocistos mostraram que a coccidiose esteve presente em todas as granjas e coletas. As médias dos escores de lesão das três espécies monitoradas estavam abaixo de 1, pelo uso constante de medicamentos anticoccidianos na ração. A técnica de PCR mostrou que a *E. acervulina* estava presente em 90% das granjas e *E. maxima* e *E. tenella* em 60% delas. As correlações entre o número de oocistos/ml e PCR não foram significativas para nenhuma das espécies, e nem para a maioria destas, entre escore de lesão e resultado de PCR. Desta forma, concluiu-se que o protocolo de PCR, do modo como foi utilizado, não pareceu adequado como método de diagnóstico da coccidiose em amostras de campo.

Palavras-chave: Coccidiose Aviária; Diagnóstico; *Eimeria* spp.; PCR; Escore de Lesão; Número de Oocistos.

ABSTRACT

Coccidiosis is one of the most common diseases in poultry industry of the world. The disease agents belong to the genus *Eimeria*, and species that parasites domestic fowl are: *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*. The three last species are the most important for chicken production and, because of that they are monitored by poultry companies in chicken commercial houses, by lesion scoring in small intestine and ceco. This research aimed to diagnose coccidiosis by PCR technique and to evaluate its utilization in disease diagnosis at Western region of Santa Catarina, Brazil. It was taken ten commercial flocks around 20 km of Concórdia, SC. The eliminated feces were immediately collected directly from houses floor, and three chickens were taken, at random. Chicks were slaughtered to evaluate lesion scoring, produced according to *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*. Oocysts were obtained from feces to later DNA extraction, for PCR assay. Oocysts counting showed that coccidiosis were present in all collects and commercial houses. Lesion scoring of the three monitored species was less than one, because of broad utilization of anticoccidial drugs. PCR showed that *E. acervulina* was present in 90% of commercial poultry houses and *E. maxima* and *E. tenella* in 60% of them. Correlations were not significant ($P>0,05$) between oocysts/ml and PCR for none of the studied species, and too considering lesion scoring and PCR, for most of them. Then, it was concluded that PCR assay, as it was used, was not adequated as a method of diagnosis to coccidiosis for field samples.

Key words: Diagnosis, *Eimeria* spp.; PCR; Poultry Coccidiosis; Lesion scoring; Number of Oocysts.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura mundial evoluiu bastante nas últimas décadas, principalmente no que se refere à produção de frangos de corte. Identifica-se uma elevação da produção mundial de carne de frango, de 8,9 milhões no ano de 1961 para 75,8 milhões de toneladas em 2003, o que configura um aumento de 747%. Neste contexto, o Brasil conquistou um espaço significativo, passando de 1,4% em 1961 (130 mil toneladas) para 10,5% da produção mundial de carne de frango em 2003 (7,9 milhões de toneladas), sendo atualmente o terceiro maior produtor de frangos de corte, após EUA e China (ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL, 2004).

Em 2004, a produção nacional atingiu 8,5 milhões de toneladas de carne de frango, sendo que a exportação brasileira foi de 2,45 milhões de toneladas, ultrapassando os EUA que exportou 2,28 milhões de toneladas (ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL, 2004).

A região Sul do País é pioneira na produção de frangos de corte, sendo seus três estados (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) responsáveis por mais de 50% da produção brasileira de 3,213 bilhões de cabeças. (ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL, 2004).

Apesar do progresso do agronegócio avícola brasileiro, a atividade se depara com perdas econômicas causadas pela coccidiose aviária, no que diz respeito principalmente à conversão alimentar e à utilização de medicamentos anticoccidianos.

A coccidiose constitui-se numa das doenças infecciosas de maior importância econômica na avicultura industrial mundial, tanto em granjas de frango de corte, matrizes e aves de postura (RUFF, 1999; KAWAZOE, 2000). Segundo DANFORTH & RUFF (1999), os prejuízos anuais associados à coccidiose chegam a US\$ 1,5 bilhões.

Segundo CASTRO (1994), as perdas no Brasil decorrentes de coccidiose subclínica chegam a US\$ 19,1 milhões anuais, sendo US\$ 11,85 milhões referentes às perdas na produção de carne e US\$ 7,25 milhões, devido ao aumento do consumo de ração.

De acordo com KAWAZOE (2000), as perdas econômicas estão associadas à morbididade persistente em decorrência da má administração dos medicamentos anticoccidianos, resistência parcial ou total aos medicamentos

preventivos nos isolados de *Eimeria spp.*, do manejo inadequado nos locais de criação e do uso inadequado de vacinas vivas virulentas, causando como consequência a redução no ganho de peso e o aumento na conversão alimentar das aves.

Os agentes causadores da coccidiose nas aves domésticas (*Gallus gallus*) são protozoários do gênero *Eimeria*: *Eimeria brunetti*, *E. praecox*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* (BORGES, 2000).

A coccidiose afeta o aproveitamento dos nutrientes, prejudicando a ingestão de ração, sua digestão, absorção, transporte de nutrientes na corrente sanguínea, e pode diminuir em até 85% a atividade digestiva de uma série de enzimas do pâncreas e mucosa intestinal. (Anuário da Avicultura Industrial, 2000).

De acordo com LONG et al. (1976), LONG & JOYNER (1984) e TSUJI (1997), o diagnóstico específico da coccidiose tem sido tradicionalmente feito pela: a) morfologia e contagem de oocistos nas fezes das aves; b) localização e morfologia dos parasitos no intestino das aves; c) presença, característica, localização e intensidade das lesões macroscópicas no intestino; d) período mínimo de pré-patência; e e) pelo tempo de esporulação dos oocistos, embora a maioria dos autores reconheçam que esses métodos de diagnóstico são primitivos, demorados e, freqüentemente ineficientes na identificação das espécies de *Eimeria*.

Uma vez que os métodos tradicionais de diagnóstico são considerados lentos e pouco precisos, novas técnicas estão sendo testadas, com o objetivo de identificar com maior agilidade os agentes envolvidos na infecção e, desta forma, os métodos de controle que poderão ser adotados. De acordo com TSUJI (1997), a identificação rápida e precisa das espécies se faz necessário para a seleção de drogas anticoccidianas, diagnóstico e para obtenção dos resultados epidemiológicos. Segundo LONG & JOYNER, 1984, os métodos convencionais para identificação das espécies exigem pessoal altamente treinado, pois as diferenças morfológicas dos oocistos são pequenas.

As técnicas moleculares são ferramentas precisas para a discriminação das espécies de *Eimeria* (TSUJI, 1997) já amplamente utilizadas no diagnóstico da coccidiose. Assim, a técnica de PCR (Polymerase Chain

Reaction) tem sido muito utilizada tanto na identificação de parasitas, como também de bactérias e vírus prejudiciais à produção animal.

As espécies de ocorrência mais freqüente em frangos de corte são *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*, sendo as mesmas monitoradas através do escore de lesão no intestino. A *E. mitis* também é comum em frangos de corte embora não seja monitorada, em parte por não produzir lesões macroscópicas que facilitem esse monitoramento e também por não ser considerada importante para a cadeia produtiva (COSTA, 2002).

A escolha das espécies a serem identificadas neste estudo relacionou-se à sua importância econômica e ao fato de que algumas delas são monitoradas pelo método do escore de lesão no intestino das aves pela indústria. A hipótese científica era de que a utilização da técnica de PCR seria um método mais preciso de identificação das espécies de *Eimeria sp* que acometem frangos de corte, comparado ao método de escore de lesões no intestino.

O presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de PCR para diagnóstico de material de campo e estudar a sua aplicabilidade no diagnóstico específico da coccidiose em frangos de corte (*Gallus gallus*) na região Oeste de Santa Catarina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Gênero *Eimeria*

RIVOLTA e SILVESTRINI (1873) classificaram como *Eimeria avium* as espécies de coccidia apresentando oocistos tetrasporocísticos, encontradas em diversas espécies de aves. Mais tarde, em 1891, RAILLIET e LUCET, descreveram o *Coccidium tenellum*, posteriormente designada *Eimeria tenella* por FANTTAM em 1909, como espécie parasita de pintos, causadora de doença no ceco, baseando as espécies nas medidas dos oocistos e em infecção experimental em pintos normais (KAWAZOE, 2000).

TYZZER (1929) descreveu três novas espécies de *Eimeria* que acometiam as aves, a *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. mitis*. Já JOHNSON (1930), descreveu duas outras espécies, a *E. necatrix* e *E. praecox*. LEVINE (1938) descreveu uma nova espécie, denominando-a *E. hagani*, que mais tarde foi considerada por pesquisadores britânicos como sub-espécie de *E. acervulina*. Ainda LEVINE (1942), descreveu uma outra espécie que denominou de *E. brunetti*. (PELLÉRDY, 1974; REID, et al., 1984).

EDGAR e SIEBOLD (1964), descreveram a espécie *E. mivati*, que mais tarde SHIRLEY(1979), identificou através do método de eletroforese enzimática como sendo uma amostra mista onde estavam presentes as espécies *E. mitis* e *E. acervulina*.

Segundo KAWAZOE (2000), as espécies do gênero *Eimeria*, pertencem ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoea*, sub-classe *Coccidia*, ordem *Eucoccidiorida*, sub-ordem *Eimeriorina*, família *Eimeriidae*. O filo *Apicomplexa* apresenta um conjunto de organelas características denominadas de complexo apical e constituídas por anéis polares, conóide (organela de penetração), microtúbulos subpeliculares, roptrias (formação do vacúolo parasitóforo), micronemas (responsável pela adesão e reconhecimento da célula hospedeira) e grânulos densos (remodelação metabólica para o desenvolvimento do parasita).

2.2. Morfologia e Ciclo Evolutivo

O gênero *Eimeria* caracteriza-se por apresentar um oocisto contendo quatro esporocistos com dois esporozoítos cada, num total de 8 esporozoítos por oocisto (FORTES, 1997). Seu ciclo de vida desenvolve-se em um único

hospedeiro (monoxeno), com multiplicação assexuada (merogonia ou esquizogonia) e sexuada (gamogonia) dentro das células do hospedeiro (estádios endógenos) e esporogonia no meio exterior (estádio exógeno) (KAWAZOE, 1994).

De acordo com LEVINE (1988) a merogonia inicia-se a partir de esporozoítos liberados de oocistos ingeridos, que penetram na parede intestinal e invadem células epiteliais, formando os merontes ou esquizontes. Esses após divisão nuclear múltipla dão origem a um número variável de merozoítos, que, quando maduros, rompem e escapam da célula hospedeira e invadem novas células onde passam por mais gerações de merogonia. Após certo número de gerações de merogonia de acordo com a espécie, os merozoítos, após invadirem novas células, dão origem a macrogamontes e microgamontes, que evoluem, respectivamente, em macrogametas (femininos) e microgametas (masculinos). Cada macrogamonte dá origem a um macrogameta, enquanto cada microgamonte dá origem a vários microgametas, por divisão nuclear múltipla. Após a maturação, os microgametas flagelados rompem as células hospedeiras e vão fecundar os macrogametas, dando origem aos zigotos, e posteriormente aos oocistos imaturos que são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro.

Os oocistos imaturos no exterior irão sofrer um processo de esporogonia, isto é, divisão meiótica seguida de divisão mitótica, dando origem a oito esporozoítos, em número de dois dentro de cada esporocisto, sob condições ideais de temperatura (28 a 30°C), oxigenação e umidade do ambiente (KAWAZOE, 2000). LONG (1977) confirma a temperatura acima como sendo ótima para ocorrer a esporulação, mas acrescenta que esse processo é inibido quando as temperatura forem abaixo de 12°C ou acima de 39°C.

As aves se infectam com as espécies de *Eimeria* quando ingerem água ou ração contaminada com oocistos esporulados, contendo a forma infectante, o esporozoíto. O processo de liberação inicia-se pela ação mecânica da moela sobre a membrana do oocisto, com posterior estimulação dos esporozoítos pela temperatura corpórea, enzimas pancreáticas e sais biliares (KAWAZOE, 2000). Segundo BORDIN (1994), quando os oocistos ingeridos atingem o intestino delgado, a tripsina quinase do suco pancreático digere o fechamento da micrópila (pequeno poro em um dos pólos do oocisto), e através desta

abertura, os esporozoítos são liberados. Uma hora após a ingestão do oocisto esporulado, já é possível encontrar esporozoítos livres na secreção intestinal, e que os esporozoítos de *E. tenella* podem permanecer por até 24 horas no conteúdo intestinal, atacando em momentos diferentes as células do ceco.

Quando os esporozoítos estão livres na luz intestinal, invadem ativamente a célula hospedeira, formando um vacúolo parasitóforo, geralmente em um enterócito, células da lâmina própria ou criptas epiteliais (KAWAZOE, 1994).

2.3.Descrição de algumas Espécies de Eimeria

***Eimeria acervulina* Tyzzer 1929**

Segundo Tyzzer (1929), os oocistos de *E. acervulina* são ovóides, mais alongados que os das demais espécies, e medem de 17,7 μ a 20,2 μ por 13,7 μ a 16,3 μ (REID et al., 1984). Invadem as células epiteliais do duodeno e intestino delgado anterior, sendo a infecção mais severa no duodeno, decrescendo até a parte mediana do intestino delgado (KAWAZOE, 2000).

COSTA (2000) descreve as lesões de *E. acervulina* como focos branco-acinzentados em forma de pontos que se unem formando estrias transversais que contém gamontes e oocistos em desenvolvimento. BORDIN (1994) confirma a presença de faixa esbranquiçada transversa no intestino delgado com a presença de oocistos, esquizontes e gametócitos sobre as vilosidades. KAWAZOE (2000) descreve que as lesões são visíveis tanto na mucosa como na serosa intestinal.

De acordo com REID e JOHNSON (1984), a patogenicidade para *E. acervulina* depende diretamente do número e da frequência de oocistos ao qual a ave é exposta. O mesmo autor cita que em uma típica infecção experimental usando 1.000, 30.000, 100.000 e 1.000.000 de oocistos, as lesões produziram escores 1 (até 5 lesões/cm², e uma leve perda de peso num período de 7 dias), 2 (lesões mais numerosas), 3 (coalescência das lesões, espessamento da parede do intestino) e 4 (maior coalescência das lesões individuais e verificada em rápida inspeção), respectivamente.

A característica desta espécie é o desenvolvimento em colônias separadas, cada uma delas contendo parasitos na mesma forma evolutiva, exceção feita para as formas sexuais que se misturam em todas as colônias.

Nas células do epitélio, o parasito ocupa posição superficial, nunca abaixo dos núcleos, podendo ocorrer mais de um esquizonte em cada célula. (REID et al., 1984).

Pelo fato de não apresentar mortalidade das aves, a não ser em casos de infecção de milhões de oocistos, a espécie foi considerada não patogênica por muitos pesquisadores, mas pelo fato de causar severa depressão no ganho de peso das aves, deve ser considerada patogênica (KAWAZOE, 2000)

***Eimeria maxima* Tyzzer 1929**

De acordo com KHEYSIN (1972), LEVINE (1973) e PELLÉRDY (1974) os oocistos de *E. maxima* são ovóides, com parede lisa ou um pouco rugosa, apresentam duas camadas e são de cor amarelada.

Segundo KAWAZOE (2000), a *E. maxima* acomete principalmente a região média do intestino delgado, além de apresentarem lesões também no duodeno e no íleo, e o nome dessa espécie se deve ao tamanho grande dos seus oocistos. REID et al (1984) descreve que os maiores oocistos medem 42,5 μ por 29,8 μ e os menores de 21,5 μ por 16,5 μ , de cor dourada, superando desta forma o tamanho dos oocistos de outras espécies. Apesar do tamanho grande dos oocistos, descreve que o oocisto maduro é menor que o microgametócito, e que os merozoítos são menores do que os das espécies *E. mitis* e *E. acervulina*.

Esta espécie deveria ser classificada como moderada a severamente patogênica; mortalidade leve a moderada tem sido relatada tanto de experimentos a campo quanto de infecções experimentais, e em vários casos há extremo emagrecimento, palidez, engrossamento das penas e anorexia. (REID et al., 1984).

BORDIN (1994) e KAWAZOE (2000) descreveram que a infecção causa enterite hemorrágica associada ao espessamento da parede intestinal, e as lesões estão confinadas geralmente à metade superior das vilosidades. O primeiro autor relata ainda que no epitélio, os esquizontes aparecem acima do núcleo e também na lâmina própria, de acordo com a severidade da doença e que as fases merogônica e gamogônica são consideradas importantes como geradoras de lesões.

Segundo REID et al. (1984), os escores de lesão estão entre 0 e 4 e são baseados nos números comparativos de petéquias, quantidade de muco sanguíneo, grau de espessamento e inchaço da porção média do intestino delgado.

***Eimeria tenella* (Railliet & Lucet, 1891) Fantham 1909**

Segundo REID et al (1984), a coccidiose cecal ou “sangrenta” é causada por invasão parasitária no ceco e áreas adjacentes do trato digestório das aves domésticas. De acordo com RUFF & REID, (1977), esse parasita é extremamente patogênico e causa alta mortalidade.

Os oocistos são ovóides, medindo de 19,5 a 26 micrômetros por 16,5 a 22,8 micrômetros de largura. Os merozoítos de 1ª e 2ª geração e os microgametócitos medem de 2-4 μ x 1-1,5 μ , 16 μ x 2 μ e 5,5 μ x 18 μ , respectivamente (REID et al., 1984).

KAWAZOE (2000) citou ainda que a infecção caracteriza-se por sangramento e espessamento da parede cecal no quinto e sexto dias após a infecção, coincidindo com a maturação da segunda geração de esquizogonia.

A súbita mortalidade causada por esta espécie pode ultrapassar os 20% das aves em um período de 2 a 3 dias; a perda de sangue por lesões no ceco, diarreia, odor característico, temperatura corporal normal embora as aves possam aparentar frio antecede a morte (REID et al. 1984). Segundo, BORDIN (1994), ocorrem modificações nas estruturas das células intestinais (células da cripta e da lâmina própria), com encurtamento na altura das vilosidades da mucosa intestinal. Essas alterações impedem a renovação da vilosidade epitelial, resultando na sua ausência e na perda contínua de fluídos, hemorragia, suscetibilidade a invasão de bactérias e subsequente formação de lesões necróticas (KAWAZOE, 2000).

De acordo com REID et al. (1984), os escores de lesão variam de acordo com o número de oocistos viáveis ingeridos. Ingestões de 150, 150-500, 1000 e 5000 ou mais, provocam os respectivos escores de lesão 1, 2, 3 e 4. O aparecimento dos oocistos nas fezes das aves se dá no 7º dia após a infecção, alcançando um pico de vários milhões por ave no 8º dia, e são reduzidos em número no 9º dia, até a cessação da produção aproximadamente no 13º dia da infecção.

***Eimeria mitis* Tyzzer 1929**

Segundo REID et al. (1984), os oocistos de *E. mitis* são menores que os de *E. tenella*, tendo em média 16,2µm x 15,5µ, quase esféricos e esporulam em 48 horas. Essa espécie acomete a metade anterior do intestino delgado e é considerado por muitos autores, não patogênica, mas estudos têm mostrado mortalidade em pintos jovens (KAWAZOE, 2000).

De acordo com SHIRLEY et al. (1983), esse parasita causa severa depressão na velocidade de ganho de peso. REID et al (1984) cita ainda que no final do 4º dia após infecção, os esquizontes contendo de 24 a 60 merozoítos aparecem espalhados entre as células epiteliais das vilosidades e que esquizontes, microgametas, e macrogametas devem desenvolver-se superficialmente ou abaixo do núcleo das células epiteliais.

2.4. Identificação das Espécies de *Eimeria*

Segundo COSTA (2000), é de extrema importância a identificação das espécies de *Eimeria*, uma vez que várias espécies acometem o mesmo hospedeiro causando patologias, evoluções e prognósticos diferentes, e muitas vezes com sensibilidades diferentes às drogas anticoccidianas.

EDGAR & SEIBOLD (1964) utilizaram vários critérios para distinguir a *E. mivati*, das demais espécies. Esses critérios foram: a) diâmetro maior e menor dos oocistos; b) formato dos oocistos; c) tempo mínimo de esporulação; d) período mínimo de pré-patência; e) localização preferencial dos parasitas no intestino (anterior, médio, posterior, etc); f) localização dos parasitas na parede do intestino (vilosidades, criptas, epitélio, lâmina própria, etc); g) tipo e localização das lesões características; h) patogenicidade; i) período de patência; j) ocorrência ou não de imunoproteção cruzada com inóculos referência de todas espécies; k) especificidade de hospedeiro.

Já REID (1973) para identificar as diferentes espécies de *Eimeria* nas aves acrescentou alguns critérios além dos recomendados por EDGAR & SEIBOLD (1964): a) índice morfométrico dos oocistos (diâmetro maior/diâmetro menor); b) a cor dos oocistos; c) as dimensões máximas dos merontes. LONG et al. (1976), recomendaram a utilização de características associadas às lesões como: a) tipo; b) localização; c) presença das fases endógenas (merontes ou gamontes); d) tempo mínimo de esporulação,

morfologia e micrometria dos oocistos e testes de imunoproteção cruzada. Nesse esquema, não consideraram a identificação das espécies que não produzem lesões macroscópicas como *E. mitis* e *E. praecox*. Segundo LONG et al (1976) consideram que a morfologia dos oocistos nunca poderá ser utilizada isoladamente na identificação das *Eimerias* da galinha, e que um oocisto isolado raramente pode ser, com certeza, atribuído a uma ou outra espécie.

LONG & JOYNER (1984), descrevem que o local de desenvolvimento dos merontes e gamontes no intestino é um importante critério de identificação das espécies de *Eimeria*. O tipo e a localização das lesões macroscópicas proporcionam a primeira indicação da *Eimeria* envolvida na infecção.

SHIRLEY (1975) utilizou a eletroforese de isoenzimas (lactato desidrogenase – LDH; glicose fosfato isomerase – GPI; 6-fosfogluconato desidrogenase – 6PGD; e glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PD) para identificar espécies e isolados da mesma espécie de *Eimeria*. A LDH mostrou diferentes padrões de migração em eletroforese em gel de amido, conforme a espécie estudada. A GPI apresentou padrões de migração diferentes para cada espécie estudada, exceto para *E. tenella* e *E. acervulina*. A 6PGD apresentou variação de migração entre duas cepas de *E. tenella*. Após esse trabalho, a análise isoenzimática passou a ser utilizada na identificação das espécies de *Eimeria* das aves domésticas (SHIRLEY, 1979; JOYNER & NORTON, 1980; CHAPMAN, 1982; GORE & LONG, 1982; SHIRLEY et al., 1983; NAKAMURA et al., 1986; KUCERA, 1990; WILLIAMS et al., 1996). Como limitação dessa técnica, CHAPMAN (1982) e KUCERA (1990) observaram que a espécie teria que representar no mínimo 10 a 20% dos oocistos da amostra para que fosse detectada.

SHIRLEY et al. (1983) estudando várias cepas de *E. mitis*, *E. mivati* e de *E. acervulina* utilizaram os seguintes critérios: a) eletroforese de isoenzimas (LDH e GPI); b) período mínimo de pré-patência; c) morfologia e micrometria de oocistos; d) capacidade de completar o ciclo evolutivo, com produção de oocistos, em ovo embrionado; e) patogenicidade, avaliada por ganho de peso e mortalidade; f) formação de lesões macroscópicas típicas; e g) testes de imunoproteção.

KUCERA (1990) para identificar as espécies de *Eimeria* prevalentes em granjas avícolas da Tchecoslováquia, utilizou: 1) morfologia e micrometria de oocistos; 2) período mínimo de pré-patência; 3) porção do intestino parasitada; 4) tipo e localização das lesões macroscópicas; 5) morfologia das fases endógenas (merontes ou gamontes) encontrados em raspados entre 5 e 7 dias após a inoculação; e 6) a eletroforese de isoenzimas (LDH e GPI) (zimodemas). Segundo o autor, a combinação dos critérios morfológicos e biológicos com a utilização dos zimodemas facilitou a identificação das amostras, mas o uso isolado tanto dos critérios morfológicos e biológicos como da eletroforese se mostrou insuficiente para identificar algumas amostras.

WILLIAMS et al. (1996), em levantamento das espécies de *Eimeria* prevalentes em granjas avícolas da França, utilizaram: 1) morfologia e micrometria de oocistos; 2) lesões macroscópicas do intestino (tipo e localização); 3) fases endógenas associadas as lesões (morfologia e localização); 4) período mínimo de pré-patência; 5) capacidade de completar o ciclo evolutivo, com produção de oocistos, em ovo embrionado; e 6) eletroforese de isoenzimas. Segundo os autores, haveria necessidade de utilizar esses seis critérios, para que cada espécie pudesse ter a sua identificação confirmada por dois ou três critérios.

Segundo COSTA (2000), a falta de um critério único que permita a identificação precisa, rápida e prática das espécies de *Eimeria* parasitas da galinha doméstica continua estimulando estudos na busca de soluções.

2.5. A Técnica de PCR

Segundo PRICHARD (1997), os principais grupos de parasitos protozoários de importância veterinária são normalmente diagnosticados utilizando microscópio em conjunto com corantes convencionais ou imunofluorescência/imunocitoquímica. Estes métodos analisam amostras de sangue ou linfonodos (*Trypanosoma*, *Babesia*, *Theileria*, etc.), fezes (*Eimeria*, *Giardia*, *Cryptosporidium*) ou fragmentos e secções de tecidos (*Eimeria*, *Neospora*, *Toxoplasma*). A definição de espécies particulares dentro de um gênero é dependente de critério morfológico, em conjunto a dados clínicos e/ou detecção de elevados títulos de anticorpos, avaliados através de ELISA

ou métodos baseados em imunofluorescência/imunohistoquímica. Porém, existe atualmente uma grande variedade de métodos baseados no PCR que têm sido delineados, primariamente sendo desenvolvidos no contexto da pesquisa, não sendo usados para diagnósticos de rotina com muita frequência.

A reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction), desenvolvida por Kary Mullis em meados da década de 80, trouxe sem dúvida um grande avanço ao diagnóstico de doenças que comprometem o desempenho dos animais e consequentemente, sua produção.

Segundo FERREIRA et al. (1998), pela facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade do PCR, esta se tornou poderosa para os estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo.

TSUJI et al. (1997) descreveram que o PCR pode amplificar uma seqüência específica de ácidos nucleicos e aumentar exponencialmente o número de cópias para detecção. A técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos, utilizados como iniciadores, conhecidos como primers (funcionam como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3' de cada primer), que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Todos os primers são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas da região alvo.

O aparelho utilizado na execução da técnica é o termociclador. Em cada ciclo do PCR, três etapas estão envolvidas: a) desnaturação da molécula de DNA alvo, obtida por elevação da temperatura para 92°C a 95°C; o anelamento dos primers as regiões alvo, ocorre com uma queda na temperatura para 35°C a 60°C; posteriormente a temperatura volta a aumentar, para 72°C, proporcionando a extensão da fita a partir da enzima DNA polimerase em cada terminal 3' dos primers. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira

que uma cópia desta seqüência é feita no processo (FERREIRA et al., 1998; REGITANO, 2001b).

O que possibilitou a completa automatização do processo do PCR foi o isolamento da DNA polimerase (Taq polimerase) por Saiki et al. (1988) a partir de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) que vive em fontes térmicas (FERREIRA et al., 1998).

De acordo com MACPHERSON & GAJADHAR, (1993) e TSUJI et al. (1997), para se utilizar a reação de PCR como método de identificação, é necessário um conhecimento prévio da seqüência de DNA que será utilizada como alvo, pois é a partir desse conhecimento que se desenham os iniciadores específicos ou primers.

De acordo com PRICHARD e TAIT (2001), as ferramentas de biologia molecular têm se tornado cada vez mais relevantes para a parasitologia veterinária, permitindo grandes avanços no estudo da biologia dos parasitos e na melhoria dos métodos de diagnóstico e de controle. Dentro disto, as seqüências únicas de DNA fornecem níveis extremamente elevados de especificidade para o diagnóstico e identificação das espécies e linhagens dos parasitos, e a PCR permite níveis bastante altos de sensibilidade.

Segundo FERNANDEZ et al. (2003), o primeiro protocolo molecular para a melhoria da acurácia da identificação das linhagens ou espécies de *Eimeria* sp. foi tentado através de análise eletroforética de variação enzimática. O número limitado de enzimas variáveis e o reduzido nível de polimorfismos restringiram a aplicação deste método em grande escala. No início da década de 1990, WELSH & MCCLELLAND (1990) e WILLIAMS et al. (1990) desenvolveram o método de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), técnica que é baseada na amplificação de alvos anônimos pelo uso de primers arbitrários. Isto gera fingerprints de bandas múltiplas. Devido a não exigência de conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos, o RAPD tem sido amplamente usado para a discriminação de populações de parasitos, inclusive a *Eimeria* (COSTA et al., 2001).

De acordo com SCHNISTZLER et al. (1999), a técnica de RAPD apresentava baixo uso e reprodutibilidade, e então estes autores desenvolveram um método de diagnóstico com PCR específico baseado na amplificação do ITS1 ribossômico. FERNANDEZ et al (2003) afirmaram que

este trabalho representou um avanço marcante no diagnóstico de *Eimeria*, mas restringe-se a um único marcador por espécie. Este fato obriga ao usuário a realizar sete reações independentes na PCR para determinar quais espécies estão presentes em uma amostra de campo.

TSUJI et al. (1997) desenvolveram uma PCR de dois passos (“nested”) para distinguir oito espécies de *Eimeria* parasitas da galinha (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*). Essa identificação se baseou em padrões de bandas de DNA espécie - específicos, produzidos por “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD – PCR), tendo o rDNA como molde. Na primeira fase desse PCR, os autores amplificaram o gene para srRNA com iniciadores desenhados por ALLSOPP et al. (1993) e específicos para amplificar esse gene em *Theileria*. O produto dessa primeira fase foi purificado e submetido a um RAPD - PCR com 10 iniciadores arbitrários. Os produtos dessa segunda fase apresentaram características espécie - específicas que permitiram identificar as oito espécies de *Eimeria* estudadas. A vantagem de se usar o gene para srRNA como molde para o RAPD - PCR, ao invés do DNA genômico, é o menor número de bandas de DNA produzidas, o que facilitaria a identificação das espécies de *Eimeria*.

2.6. Eletroforese em Gel de Agarose

O termo eletroforese é utilizado para descrever o movimento de íons em solução como consequência da aplicação de um campo elétrico (NAOUM, 1990).

Segundo REGITANO (2001a), os primeiros processos de eletroforese eram realizados com os íons livres em solução, sendo posteriormente modificados pela introdução de um suporte inerte (papel, ágar, agarose, poliacrilamida, etc).

A técnica baseia-se na movimentação de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) através de uma matriz tamponada (amido, agarose, acrilamida), e o processo de separação de fragmentos de DNA por eletroforese depende, basicamente, do tamanho do fragmento, da concentração da agarose e da voltagem aplicada durante o método. No caso específico dos ácidos nucleicos, o grupo fosfato é responsável pela forte carga

negativa em condições de pH neutro, fazendo com que os fragmentos migrem para o pólo positivo durante a eletroforese (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

De acordo com NAOUM (1990), a agarose é um polissacarídeo que no estado puro se apresenta como um pó branco obtido das paredes celulares de algas marinhas. Este gel pode ser utilizado para uma ampla variedade de análises, e quando comparado com outros géis apresenta três grandes vantagens: facilidade de manuseio, de conservação e baixo custo operacional.

A eletroforese em agarose tem sido um dos métodos de eleição para a separação de fragmentos de DNA com tamanho entre 0,5 e 25 kb. As condições de separação devem atender a alguns critérios como a concentração de agarose, a corrente e a capacidade de tamponamento das soluções utilizadas de modo a permitir a resolução adequada (REGITANO, 2001a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O experimento foi conduzido na cidade de Concórdia-SC, localizada na região Oeste do Estado, com uma área de 806,3 mil m². O clima segundo a classificação de Hoeffen, é do tipo Cfa – Subtropical (mesotérmico úmido com verão quente), com temperatura média anual entre 18 e 19°C, precipitação pluviométrica entre 1700 a 1900 mm e umidade relativa do ar entre 76 e 78%.

Para a colheita do material, foram utilizadas 10 granjas integradas da empresa Sadia, distribuídas num raio de 20 km do município.

O processamento de todo o material coletado realizou-se no Laboratório de Sanidade do Centro de Pesquisas em Suínos e Aves da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Suínos e Aves).

3.2. Colheita de Fezes

As colheitas do material a ser analisado ocorreram nos meses de maio, julho e setembro de 2003, e o material foi coletado diretamente do piso dos aviários. Os mesmos continham de 7500 a 15000 aves, considerando os galpões de 50 m e 100 m de comprimento, respectivamente.

Eram coletadas três amostras compostas de fezes recém eliminadas, que eram acondicionadas em frascos de 500 ml, contendo 175 ml de bicromato de potássio a 2,5% e completado com o material colhido, até atingir 350 ml do frasco, conforme a técnica utilizada por FRANCO (1993).

Para cada uma das três amostras colhidas em cada granja, seguiu-se o mesmo percurso dentro do galpão, sendo a primeira amostra colhida em zigue-zague, de uma até a outra extremidade da instalação (lado direito). Na segunda colheita, fazia-se o caminho inverso ao da primeira (lado esquerdo), e para a terceira, caminhava-se entre os comedouros e bebedouros do galpão. Desta forma, percorria-se 3 vezes o comprimento do galpão. As colheitas totalizaram 90 amostras nas três coletas em todas as granjas no período experimental.

3.3. Colheita das Aves

Juntamente com as amostras compostas de fezes, colhiam-se três frangos que estavam com idade entre 28 e 42 dias, aleatoriamente dentro de cada galpão totalizando 90 aves durante todas as coletas nas 10 granjas. Objetivava-se posteriormente realizar análise macroscópica do intestino, buscando verificar escores de lesões características das espécies: *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*.

3.4. Avaliação dos Escores de Lesão

Após a colheita dos três frangos por granja, esses eram levados para o Laboratório de Sanidade do CNPSA-EMBRAPA de Concórdia, onde as aves eram sacrificadas e retirava-se o intestino delgado e o ceco para avaliação dos escores de lesão.

Os escores, segundo JOHNSON e REID (1970), eram os seguintes:

a) Escore de lesões por *Eimeria acervulina*.

Escore	Lesões
0	Ausência de lesões
1	Pontos ou estrias brancas, vistas da serosa ou mucosa, esparsas (até 5 por cm ²) e confinadas ao duodeno
2	Pontos ou estrias brancas mais numerosas, mas não coalescentes, se estendem até ao meio entre duodeno e divertículo; conteúdo intestinal normal
3	Pontos ou estrias brancas já coalescendo com redução de tamanho, se estendem até o divertículo; parede intestinal engrossada e conteúdo intestinal aquoso
4	Pontos ou estrias brancas completamente coalescentes, dando à mucosa do intestino uma coloração acinzentada; lesões típicas só no intestino médio; parede intestinal engrossada e conteúdo cremoso

b) Escore de lesões por *Eimeria maxima*.

Escore	Lesões
0	Ausência de lesões
1	Pequenas petéquias vistas da serosa no intestino médio; pode haver pequena quantidade de muco alaranjado; sem balonamento nem engrossamento do intestino
2	Superfície serosa pintada com numerosas petéquias; o intestino pode estar cheio de muco alaranjado; pouco balonamento e engrossamento do intestino
3	Parede do intestino está embalonado e engrossada; superfície mucosa áspera; conteúdo do intestino com pequenos coágulos
4	Parede intestinal engrossada e embalonada em quase toda sua extensão; contém coágulos no conteúdo intestinal

c) Escore de lesões por *Eimeria tenella*.

Escore	Lesões
0	Ausência de lesões
1	Muito poucas petéquias dispersas na parede cecal; ausência de engrossamento na parede cecal; conteúdo cecal normal
2	Número maior de petéquias e sangue presente no conteúdo cecal; parede cecal um pouco engrossada; presença de conteúdo cecal normal
3	Grande quantidade de sangue ou tampão cecal presente; parede cecal bem engrossada; pouco ou nenhum conteúdo fecal no ceco
4	Parede cecal distendida com sangue ou tampão caseoso; material fecal ausente ou incluído no tampão caseoso;

3.5. Colheita e Armazenamento de Oocistos de *Eimeria*, segundo COSTA (2000).

A separação dos oocistos das 3 amostras iniciais de fezes colhidas de cada granja, para posterior armazenamento, seguiu o seguinte protocolo:

1. Adicionar água estéril e detergente neutro (1 a 3ml), também autoclavado, às fezes;
2. Homogeneizar completamente as fezes com multi mix, esterilizado;
3. Passar o material homogeneizado em telas de tecido (filó, crepon, voal, e fralda de algodão), esterilizadas;
4. Colocar o filtrado em tubos e centrifugar a 1000 g, por 5 minutos; descartar o sobrenadante e agitar o sedimento;
5. Repetir o passo 5 até limpar o sobrenadante (4 vezes);
6. Resuspender o sedimento em solução 5,5 M (saturada) de NaCl (densidade de 1,209 g/ml), no mesmo tubo, homogeneizar com pipeta de transferência, e centrifugar a 200 g, por 10 minutos;
7. Remover oocistos da superfície da solução com pipeta com ponta em bixel, e resuspender o sedimento;
8. Repetir os passos 6 e 7 até limpar a superfície (3 vezes); repetir os passos 6 e 7 em tubo menor por 3 vezes;
9. Resuspender a suspensão de oocistos em água (1 parte do sobrenadante do passo 7: 10 partes finais ou mais) e centrifugar a 1000g por 5 minutos; descartar o sobrenadante;
10. Resuspender em bicromato 2,5% e quantificar os oocistos.

Os oocistos eram quantificados através de microscópio, com aumento de 400 vezes (ocular de 10 vezes x objetiva de 40 vezes) em câmara de Neubauer, chegando aos valores de número de oocistos/ml e número total de oocistos em cada amostra das coletas.

Após, eram guardados em frascos contendo 5ml de bicromato 2,5% até a etapa de extração do DNA dessas amostras.

3.6.Processamento de Oocistos de *Eimeria* para Extração de DNA, modificado de PASTERNAK et al. (1981) e de ZHAO et al (2001).

1.Centrifugação das amostras de campo em bicromato de potássio a 2,5% a 1000g por 5 minutos a 4°C. Acrescentar duas gotas de detergente (autoclavado) por tubo de centrifugação;

2.Lavar esse material, no mínimo 4 vezes através de centrifugações em dH₂O a 1000g por 5 minutos a 15°C, para eliminar o bicromato;

3.Suspender o pellet final em solução saturada de NaCl (densidade de 1,209 g/ml), acrescentar duas gotas de detergente autoclavado por tubo, homogeneizar bem, cobrir com 1 – 2 ml de água destilada (dH₂O) e centrifugar a 200g (908 rpm no rotor cat. n° 269 com suporte cat. n° 305 de 19,6cm de raio) por 10 minutos;

4.Colher os oocistos no limite entre a solução saturada (NaCl) e a dH₂O; diluir em dH₂O a 1:10;

5. Lavar oocistos através de 6 centrifugações em dH₂O :1000 g, 500 g, 200 g e 1000 g , por 5 minutos.

6. Suspender o pellet de oocistos em 200 µL de 5,75% de hipoclorito de Sódio, e incubar no gelo por 30 minutos.

7. Adicionar 9 volumes de água destilada e centrifugar a 1600 g por 5 minutos para peletizar os oocistos;

8. Suspender o pellet de oocistos em 80 µL de tampão de lise (660 mM EDTA, 1,3% N-lauroylsarcosine, 2 mg/ml proteinase K, pH 9,5) e incubar a 65°C por 45 minutos. Acrescentar a proteinase K separada, diluindo a solução estoque (5 X) de proteinase (10 mg/ml) em 1:5 (20 µL proteinase: 80 µL tampão de lise);

9. Adicionar 350 μL de tampão Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (2% por volume CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2% β -mercapto-ethanol, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS) e incubar a 60° por 1 hora;

10. Adicionar 1 volume de fenol : clorofórmio : isoamyl álcool (PCIA, 25:24:1) por volume de amostra de DNA (colocando 450 μL de PCIA);

11. Misturar o conteúdo do tubo, por inversão, até que se forme uma emulsão (10 minutos);

12. Centrifugar a 845,2 g (3000 rpm em rotor de 84 mm) por 5 minutos a 4°C em microcentrífuga Eppendorf;

13. Transferir a fase aquosa para outro tubo;

14. Precipitar o DNA, adicionando 1/25 volume (20 μL para 500 μL) de 4 M NaCl e 2 – 3 volume de 100% etanol frio, e agitando bem;

15. Incubar o frasco com DNA por 20 – 30 minutos a -20°C;

16. Peletizar o DNA por centrifugação a 9400g (10.00 rpm em rotor de 84 mm) por 20 minutos a 4°C em microcentrífuga; decantar o etanol absoluto com movimento suave;

17. Lavar com 70% etanol;

18. Secar o pelet de DNA e resuspending em água miliQ.

3.7. Programa da Reação de PCR

Os reagentes utilizados e os volumes por amostra encontram-se listados a seguir:

Reagentes	Volume/Amostra
H ₂ O miliQ	15,7 μL
tampão da reação (10 X)	2,5 μL
dNTPs 10mM* = 10000 μM (200X)	0,125 μL cada; 0,5 μL todos - 50 μM
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μL – 2mM
Primers	1,0 μL cada; 2,0 μL todos – 10 pmol
Taq polimerase	0,5 μL – 0,5U
DNA genômico	2,8 μL
TOTAL	25μL

TABELA 1. PRIMERS USADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Espécies	Primer	Seqüências (5')
<i>Eimeria acervulina</i>	EaF	GGC.TTG.GAT.GAT.GTT.TGC.TG
<i>Eimeria acervulina</i>	EaR	CGA.ACG.CAA.TAA.CAC.ACG.CT
<i>Eimeria máxima</i>	EmaF	GTG.GGA.CTG.TGG.TGA.TGG.GG
<i>Eimeria máxima</i>	EmaR	ACC.AGC.ATG.CGC.TCA.CAA.CCC
<i>Eimeria tenella</i>	EtF	AAT.TTA.GTC.CAT.CGC.AAC.CCT
<i>Eimeria tenella</i>	EtR	CGA.GCG.CTC.TGC.ATA.CGA.CA
<i>Eimeria mitis</i>	EmiF	TAT.TTC.CTG.TCG.TCG.TCT.CGC
<i>Eimeria mitis</i>	EmiR	GTA.TGC.AAG.AGA.GAA.TCG.GGA

Fonte: Schnitzler et al. (1998).

Depois da adição de todos os ingredientes, esses eram levados para o Termociclador (EPPENDORF - mastercycler personal) para o início da reação, seguindo os seguintes passos:

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO	
1	94°C	3 min	
2	94°C	30 s	
3	62°C	30 s	30 ciclos
4	72°C	1 min	
5	72°C	5 min	
6	4°C	30 min	

Fonte: Schnitzler et al. (1999).

3.8. Padronização do PCR

A padronização do PCR se fez utilizando DNA extraído de oocistos puros das espécies de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* extraídos de fezes de frangos SPF por COSTA (2003). O protocolo utilizado na extração do DNA foi descrito por PASTERNAK et al. (1981). Os primers eram específicos para cada uma das três espécies que seriam utilizadas no trabalho (SCHNITZLER et al., 1998).

A padronização da técnica de PCR constituiu-se de duas fases. Na primeira, utilizou-se DNA genômico com primers específicos para cada uma das espécies (DNA de *E. acervulina* e primers EaF e EaR; DNA de *E. maxima* e primers EmaF e EmaR; DNA de *E. tenella* e primers EtF e EtR; DNA de *E. mitis* e primers EmiF e EmiR), para verificar a especificidade dos primers com a espécie em questão. Na fase seguinte utilizou-se primers de cada uma das quatro espécies estudadas com DNA de colônias puras das outras espécies (a: primers de *E. acervulina* com DNA genômico de *E. maxima*, *E. tenella* e *E. mitis*; b: primers de *E. maxima* com DNA genômico de *E. acervulina*, *E. tenella*

e *E. mitis*; c: primers de *E. tenella* com DNA genômico de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. mitis*; d: primers de *E. mitis* com DNA genômico de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*) para verificar reação cruzada entre primers e DNA genômico de espécies diferentes.

Exemplo da padronização: reação contendo DNA de quatro diferentes cepas de *E. acervulina* (EaBP2, EaLP8a e EaLP8aP12aC1) e primers EaF e EaR. As amostras 2, 3 e 4 se apresentaram amplificadas, ou seja, mostraram-se positivas ao gel de poliacrilamida (6,7%) indicando assim que o PCR estava pronto para ser utilizado com as amostras de campo. Verificou-se o mesmo resultado quando a eletroforese era realizada com gel de agarose 1,5%. Portanto optou-se pela agarose, por ser seu preparo mais simples e rápido.

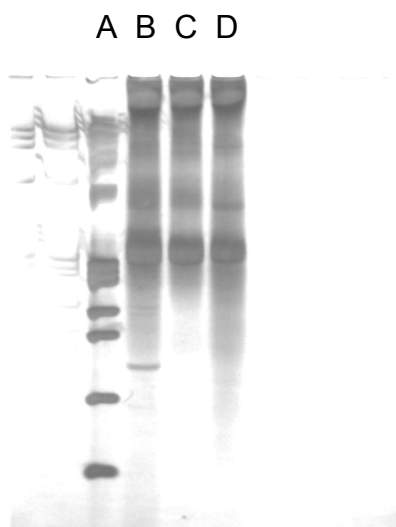


Figura 1. A(Peso Molecular: x 176), B(EaBP2), C(EaLP8a) e D(EaLP8a P12aC1).

3.9. Eletroforese no Gel de Agarose

Para a confecção do gel de agarose utilizava-se:

- a) pesagem da quantidade de agarose necessária para uma concentração de 1,5% no gel;
- b) adição da agarose ao tampão TBE 1X em um frasco de Erlenmeyer;
- c) aquecimento em forno de microondas até o início da ebulição para liquefazer a agarose; deixar esfriar até atingir entre 50 e 60°C;
- d) adição de brometo de etídio na quantidade de 15 µL/100ml de gel;

e) verter a agarose sobre o molde, colocação dos pentes, deixar solidificar e montar o sistema na cuba de eletroforese, submergindo em tampão TBE 1X (TBE 10X concentrado: Tris, 0,89 M; Ácido Bórico, 0,89 M; EDTA, 0,02 M);

f) adicionava-se 5 μ L tampão da amostra (*loading buffer*) 6X concentrado (Bromophenol Blue, 0,25%; Xileno Cianol 0,25%; Glicerol, 30,0%) em cada amostra.

g) submetia-se o sistema a uma corrente de 100 volts;

h) os resultados eram visualizados sob luz ultravioleta a uma potência de 2600 μ W/cm²;

i) utilizava-se um equipamento digital de fotodocumentação para arquivar as imagens em computador (Adaptado de REGITANO, 2001a).

As reações de PCR e a eletroforese em gel de agarose e seus resultados encontram-se descritos no Apêndice.

3.10. Análise Estatística

Os dados foram analisados de acordo com o método de Correlações Simples de Pearson, pelo Programa Estatístico SAS (1996).

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Número de Oocistos de *Eimeria* nas Fezes

Os resultados do número de oocistos/ml nas 10 granjas durante as três coletas estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. NÚMERO DE OOCISTOS/ML NAS GRANJAS DE FRANGOS DE CORTE DURANTE AS COLETAS NA REGIÃO DE CONCÓRDIA-SC.

Granja	Coletas			Média/Granja
	1	2	3	
1	6571,67	609,33	4723,67	3968,22
2	6876,00	1133,33	9237,67	5749,00
3	6447,67	7161,67	8590,00	7399,78
4	6590,33	22723,33	4437,67	11250,44
5	1323,67	313,67	1256,67	964,67
6	1580,67	951,67	18856,67	7129,67
7	39428,67	26285,33	29066,00	31593,33
8	14171,00	19542,33	7980,67	13898,00
9	3160,33	1923,33	9276,00	4786,56
10	5342,67	4656,67	3142,67	4380,67
Média/Coleta	9149,27	8530,07	9656,77	9112,03

A ocorrência de coccidiose foi comprovada pelas quantidades de oocistos encontradas nas fezes dos frangos nas 90 amostras de todas as granjas pesquisadas em Concórdia-SC.

MAHO (2000), estudando 342 granjas em North-Guéra, Chad durante a estação chuvosa de 1998, identificaram 13 espécies de parasitas nas aves com prevalência global de parasitoses de 59%, dos quais 27% eram coccidioses causadas pelo gênero *Eimeria*. Esses resultados estão de acordo com a afirmação de WILLIAMS (1999) citado por COSTA (2002), que a coccidiose é uma das doenças mais freqüentes na avicultura industrial mundial.

É provável que o número de oocistos encontrados durante as coletas não sejam somente das três espécies (*E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*) monitoradas pela indústria avícola em frangos de corte. TERRA (2001)

avaliando a frequência das espécies do gênero *Eimeria* em criações comerciais de frangos de corte em Monte Alegre do Sul-SP, através do exame parasitológico de raspados da mucosa intestinal, levando-se em consideração os aspectos morfométricos dos oocistos, comprovou a presença de seis espécies: *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. mitis* e *E. necatrix*.

COSTA (2000) obteve na região de Pará de Minas-MG, 10 isolados de campo para *Eimeria*, compreendendo 1 de *E. acervulina*, 3 de *E. mitis* e 6 de *E. praecox*, mostrando assim a ocorrência de outras espécies, que não aquelas monitoradas pelas empresas avícolas.

O presente trabalho utilizou amostras de campo para diagnóstico através do PCR, o que não ocorreu nos trabalhos anteriormente citados, que utilizaram RAPD (COSTA, 2000), aspectos morfométricos dos oocistos (MAHO, 2000; TERRA, 2001).

4.2. Escores de Lesão no Intestino dos Frangos

A avaliação do escore de lesão no intestino dos frangos mostrou que as três espécies monitoradas (*E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*) estavam presentes na maior parte das granjas. Considerando a média dos escores de lesão, conforme se apresenta na Tabela 3, a *E. maxima* foi a que causou maior escore de lesão no intestino dos frangos, com valor próximo de 1.

TABELA 3. MÉDIA DO ESCORE DE LESÃO NO INTESTINO DOS TRÊS FRANGOS DAS 10 GRANJAS NA REGIÃO DE CONCÓRDIA-SC.

Granja	<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. tenella</i>
1	0,33333	1,00000	0,66667
2	0,33333	1,11111	0,66667
3	0,44444	1,00000	1,00000
4	0,66667	0,66667	0,22222
5	0,22222	1,33333	0,11111
6	0,11111	1,00000	0,33333
7	0,66667	0,88889	1,22222
8	0,00000	0,77778	0,33333
9	0,11111	0,66667	0,88889
10	0,11111	1,11111	0,44444
Média	0,30000	0,95556	0,58889

Os baixos valores de escores devem-se a utilização de anticoccidianos (Salinomicina, Monensina, Lasalocida, Narasin) na ração dos frangos na fase inicial (1º ao 21º dia) e na fase final (22º dia ao 5º-7º dia antes do abate) (COSTA, 2002). Os frangos abatidos para avaliação do escore encontravam-se nesta última fase. Os resultados poderiam ser diferentes se as aves avaliadas estivessem na fase inicial, pois o grau de escore de lesão encontrado no intestino das aves seria maior.

A utilização do escore de lesão para avaliar a presença de algumas das espécies de *Eimeria*, tem sido frequentemente utilizada pela indústria avícola nacional, pois é um método simples e rápido de identificação. É necessário lembrar que esse método não se aplica à todas as espécies de *Eimeria*, pois algumas (*E. mitis* e *E. praecox*) não produzem lesões macroscópicas que possam ser identificadas visualmente (KAWAZOE, 1994; COSTA, 2002).

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Os resultados das 90 extrações de DNA submetidas ao PCR encontram-se na Tabela 4. Esses resultados são provenientes de 4 reações por amostra extraída, com os primers específicos das espécies estudadas totalizando 360 reações.

TABELA 4. NÚMERO DE GRANJAS POSITIVAS NO PCR AS PARA ESPÉCIES DE EIMERIA (RESULTADO DE TRÊS COLETAS)

	<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. tenella</i>	<i>E. mitis</i>
Positivo	09	06	06	0
Negativo	01	04	04	10

A *E. mitis* foi a única espécie cujos resultados foram negativos, ou seja, a mesma não foi detectada pelo PCR. Esses resultados indicam a não ocorrência dessa espécie nas granjas estudadas. As demais foram identificadas pelo método, sendo que a *E. acervulina* foi a espécie mais presente, em 90% das granjas. Isto talvez pelo fato de que os protocolos utilizaram oocistos como fonte de DNA para pesquisa das espécies, e como a *E. acervulina* é grande produtora de oocistos (LONG e JOYNER, 1984), a quantidade de DNA extraída deve ter sido maior e, portanto, o PCR foi mais sensível que o escore de lesão para detectar a infecção. A princípio, os resultados sugerem que essa espécie é a mais encontrada nas amostras de campo. Já a *E. maxima* e *E. tenella* estavam presentes em 60% das granjas.

O PCR das espécies de *E. maxima* e *E. tenella* apresentou-se na mesma proporção para as granjas observadas (6 resultados positivos e 4 resultados negativos), mas a média do escore de lesão (Tabela 2) para *E. maxima* foi superior ao da *E. tenella*, talvez pelo fato da espécie em questão ser grande produtora de lesões na porção média do intestino.

A figura 2 refere-se aos resultados do PCR visualizados no gel de agarose 1,5%, da coleta 1, granja de 1 a 10 e amostra 1, utilizando-se os primers EaF e EaR de *E. acervulina*. Os resultados positivos foram verificados somente nas granjas 2 e 7.

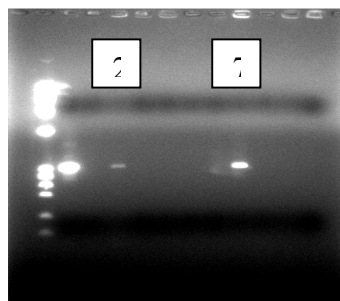


Figura 2. 2 (granja 2, coleta 1, amostra 1) e 7 (granja 7, coleta 1, amostra 1).

4.4. Correlações entre Número de Oocistos, Escore de Lesão e PCR

Os resultados da análise de correlações entre as variáveis avaliadas encontram-se na Tabela 5.

TABELA 5. CORRELAÇÕES ENTRE O RESULTADO DO PCR, NÚMERO DE OOCISTOS/ML E OS ESCORES DE LESÃO NO INTESTINO DOS FRANGOS CAUSADOS PELAS ESPÉCIES DE *EIMERIA*.

Escore	PCR			Número de oocistos/ml
	<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. tenella</i>	
<i>E. acervulina</i>	-0,12561 0,5084	-0,37027 0,0440*	-0,14631 0,4404	0,45634 0,0113*
<i>E. maxima</i>	-0,00789 0,9670	-0,09945 0,6011	0,01268 0,9470	-0,28281 0,1299
<i>E. tenella</i>	-0,24089 0,1997	-0,32924 0,0756	-0,37790 0,0395*	0,47737 0,0076*
Número de oocistos/ml	-0,04315 0,8209	-0,19832 0,2935	-0,08758 0,6454	1,00000

* Correlações significativas a 5%

A correlação entre número de oocistos/ml com escore de lesão foi positiva e significativa ($p < 0,05$) somente para as espécies de *E. acervulina* e *E. tenella*, ou seja, quando maior o número de oocistos maior era também o escore que a espécie produzia. Para *E. maxima*, a correlação não foi significativa entre o escore de lesão e o número de oocistos/ml e nem entre escore de lesão e PCR. Isto pode indicar que a espécie é grande produtora de lesões e faz isso com pequeno número de parasitas.

Não houve correlação ($p > 0,05$) entre o número de oocistos/ml com o resultado de PCR para nenhuma das três espécies (*E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*) estudadas, isso talvez pelo fato de se ter coletado oocistos, enquanto quem estava provocando lesão eram outras fases do ciclo, como merontes e gamontes.

Entre o resultado de PCR e escore de lesão houve correlação significativa negativa somente para a *E. tenella*, ou seja, quando o resultado do PCR era positivo, os valores de escore de lesão observados no ceco dos frangos foram menores. Esse resultado talvez seja explicado porque o material submetido ao PCR era proveniente de DNA de oocistos e o que

estava causando lesões no ceco das aves eram os merontes da fase de merogonia (PELLÉRDY, 1974).

Parte dos resultados incoerentes nas correlações, como por exemplo entre o escore de lesão produzido pela *E. acervulina* e o resultado do PCR para essa espécie (Tabela 4), provavelmente estão relacionados ao número de aves colhidas nas granjas, apesar desse número (3 aves) estar muito próximo daquele utilizado pela indústria avícola (5 aves), e talvez não seja representativo do número de aves presentes em cada galpão (7500 a 15000 aves aproximadamente).

Outra hipótese para a falta de correlação entre as variáveis analisadas pode estar relacionada ao material coletado. O DNA submetido ao PCR era proveniente dos oocistos presentes nas fezes colhidas diretamente da cama do aviário, e as fases do parasito que causam os escores de lesão, estão nas células epiteliais do intestino das aves (PELLÉRDY, 1974). Talvez, se a colheita fosse feita diretamente do intestino delgado e ceco por raspado (TERRA et al., 2001) logo após a avaliação do escore de lesão, a correlação entre escore de lesão e PCR fosse significativa e positiva.

5.CONCLUSÕES

Verificou-se a ocorrência de todas as espécies de *Eimeria*, que são monitoradas (*E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*) pela indústria avícola, nas granjas estudadas na região de Concórdia-SC.

Não foram observadas correlações significativas ($p>0,05$) entre o escore de lesão no intestino delgado e ceco dos frangos e o resultado do PCR, e nem entre o resultado de PCR e o número de oocistos/ml para nenhuma das espécies.

O protocolo utilizado no PCR não se mostrou eficiente no diagnóstico da enfermidade a campo para material coletado de fezes.

O material proveniente da cama dos aviários, utilizado como fonte de DNA neste trabalho, pode não ser o mais indicado para identificação das espécies que estão parasitando os frangos, sugerindo-se que o material seja colhido diretamente do intestino através de raspado.

Verificou-se ausência de *E. mitis* nas granjas estudadas em todas as coletas realizadas.

REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL. Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. n. 1129/2004. [on line] Disponível na internet via [www.url.http://www.aviculturaindustrial.com.br](http://www.aviculturaindustrial.com.br) Arquivo capturado em 20 de julho de 2005.
- ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL. O avanço da utilização de vacinas e o uso de prébióticos e probióticos em substituição aos aditivos e promotores de crescimento devem ser as estratégias usadas no combate à coccidiose nos próximos anos. n. 1081/2000. [on line] Disponível na internet via [www.url.http://www.aviculturaindustrial.com.br](http://www.aviculturaindustrial.com.br) Arquivo capturado em 20 de julho de 2005.
- BORDIN, E.L. Patologia da Coccidiose. In: Simpósio Internacional sobre Coccidiose, Santos, SP, FACTA, 1994. **Anais...**, 1994. cap. 2. p.7-10.
- BORGES, A. Vacinas – Método Natural de proteção – para Coccidiose. In: Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM, 2, Santa Maria, RS, 2000. **Anais...**, 2000. p.55-63.
- CASTRO, A.G.M. de. Situação atual da coccidiose no Brasil. Importância econômica. In: Simpósio Internacional de Coccidiose. Santos, SP, FACTA, 1994. **Anais...** FACTA, 1994. p. 45-54.
- CHAPMAN, H.D. The use of enzyme electrophoresis for the identification of the species of *Eimeria* present in field isolates of coccidia. **Parasitology**, v. 85, p. 437 - 442, 1982.
- COSTA, C.A.F. Caracterização biológica e estudo da variabilidade genética inter e intra-específica de algumas espécies de *Eimeria* de *Gallus gallus* em Minas Gerais - Brasil. Belo Horizonte, 122f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
- COSTA, C.A.F. Controle da coccidiose: possíveis avanços. In: Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM, 3, Santa Maria, RS, 2002. **Anais...**, 2002. p.36-47.
- COSTA, C.A.F.; GOMES, R.F.; MELO, M.N.; RIBEIRO, M.F.B. *Eimeria* parasites of domestic fowl: genetic relationships of different isolates estimated from random polymorphic DNA. **Parasitology Research**, v. 87: p. 459-466, 2001.

- DANFORTH, H.D.; RUFF, M.D. Mecanismo de indução de resistência às drogas anti-coccidianas. In: Simpósio Internacional de Coccidiose, 2. Foz do Iguaçu, PR, FACTA, 1999. Anais... FACTA, 1999.p.45-51.
- EDGAR, S.A., SEIBOLD, C.T. A new coccidium of chickens, *Eimeria mivati* sp. n. (Protozoa: Eimeriidae) with details of its life history. J. Parasitol., v. 50, p. 193 - 204, 1964.
- FERNANDEZ, S.; COSTA, A.C.; KATSUYAMA, A.M.; MADEIRA, A.M.B.N.; GRUBER, A. A survey of the inter- and intraspecific RAPD markers of *Eimeria* spp. Of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools. *Parasitology Research*, v. 89: p. 437-445, 2003.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FORTES, E. Parasitologia Veterinária. 3ª ed. São Paulo: Ícone Editora Ltda, 1997. 686 p.
- FRANCO, R.M.B. Levantamento de eimeriose em duas granjas de aves de postura da região de Campinas, São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 45, p. 557 - 571, 1993.
- GORE, T. C., LONG, P.L. The biology and pathogenicity of a recent field isolate of *Eimeria praecox* Johnson, 1930. *Journal of Protozoology*, v. 29, p. 82 - 85, 1982.
- JOHNSON, J; REID, W.M. Anticoccidial Drugs: Lesion scoring techniques in Battery and Floor-Pen Experiments with chickens. *Experimental Parasitology*, v. 28: p. 30-36, 1970.
- JOYNER, L.P., NORTON, C.C. The *Eimeria acervulina* complex: problems of differentiation of *Eimeria acervulina*, *E. mitis* and *E. mivati*. *Protozoology. Abstracts*, v. 4, p. 45 - 52, 1980.
- KAWAZOE, U. Biologia. In: Simpósio Internacional sobre Coccidiose, Santos, SP, FACTA, 1994. **Anais...**, 1994. cap. 1. p.1-6.
- KAWAZOE, U. Coccidiose. In: Berchieri, Jr., A.; Macari, M. Doenças das Aves. Campinas: FACTA, 2000. p. 391- 405.
- KHEYSIN, Y.M. Life cycles of coccidia of domestic animals. Baltimore, University Park Press, 1972.

- KUCERA, J. Identification of *Eimeria* species in Czechoslovakia. Avian Pathology, v. 19, p. 59 - 66, 1990.
- LEVINE, N. D. Protozoan parasites of domestic animals and of man. 2.ed., Minneapolis, Burgess Publ. Co., 1973.
- LEVINE, N. D. The protozoan phylum Apicomplexa. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, 1988. Vol. 1.
- LONG, P. L., JOYNER, L. P. Problems in the identification of species of *Eimeria*. Journal of Protozoology, v. 31, p. 535 - 541, 1984.
- LONG, P.L. The problem of coccidiosis; general considerations. In Avian Coccidiosis, Poultry Science Symposium. p. 3 – 28. 1977.
- LONG, P.L.; JOYNER, L.P.; MILLARD, B.J.; NORTON, C.C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. Folia Vet. Latina, v. 6, p. 201 – 217, 1976.
- MacPHERSON, J.M., GAJADHAR, A. A. Differentiation of seven *Eimeria* species by random amplified polymorphic DNA. Veterinary Parasitology, v. 45, p. 257 - 266, 1993.
- MAHO, A.; YOUSSEF, K.; MBEURNODJI, L.; SABOUNE, M.; MOPATE, L.Y. Prevalence of parasitosis of the digestive tract of local chickens (*Gallus gallus*) in North-Guéra, Chad. [on line] Disponível na internet via [www.url.http://www.scielo.br/scielo.php](http://www.scielo.br/scielo.php). Arquivo capturado em 30 de julho de 2005.
- MEIRELES, M.V.; ROBERTO, L.O.; RIERA, R.F. Identification of *Eimeria mitis* and *Eimeria praecox* in broiler feces using polymerase chain reaction. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v.6, n.4, p.32-39, 2004.
- NAKAMURA, T., KONISHI, T., KAWAGUCHI, H. Isozymes of chicken coccidia in Japan. Japanese Journal of Veterinary Science, v. 48, p. 587 - 590, 1986.
- NAOUM, P.C. Eletroforese: Técnicas e diagnósticos. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1990. 174 p.
- PASTERNAK, J., WINKFEIN, R. J., FERNANDO, M. A. Ribosomal and translatable messenger RNA of *Eimeria tenella*. Molecular Biochemistry Parasitology, v. 3, p. 133 - 142, 1981.
- PELLÉRDY, L. Coccidia and Coccidiosis. 2 ed., Berlin, Verlag Paul Parey, 1974. p. 220 - 261.

- PRICHARD, R. Application of molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v.71, p. 155-175, 1997.
- PRICHARD, R.; TAIT, A. The role of molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 169-194, 2001.
- REGITANO, L. C. DE A. **Extração de DNA para aplicação em Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**. In: Regitano, L.C. de A.; Coutinho, L.L. Biologia molecular aplicada à produção animal. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, p. 181-186, 2001a.
- REGITANO, L. C. DE A. **Introdução à Análise de Marcadores Moleculares**. In: Regitano, L.C. de A.; Coutinho, L.L. Biologia molecular aplicada à produção animal. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, p. 26-39, 2001b.
- REID, W.M. A diagnostic chart for nine species of fowl coccidia. Athens, Georgia, USA, University of Georgia, 1973. **(Research Report, 193)**.
- REID, M.W.; LONG, P.L.; MCDOUGALD, L.R. Coccidiosis. In: M.S. Hofstad et al. **Diseases of Poultry**. 8a. ed. Iowa: Iowa State Univ. Press, 1984. p. 693-717.
- RUFF, M.D.; REID, W.M. Avian Coccidia. In: Parasitic Protozoo. Gregarines, Haemogregarines, Coccidia, Plasmodia and Haemoproteids. Kreier JP Ed. New York:Academic Press Inc.; 1977. Vol III; p. 33-69.
- RUFF, M.D. Important parasites in poultry production systems. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p.337-347, 1999.
- SAS Institute. **SAS language guide for personal computer**, 1996.
- SCHNITZLER, B.E.; THEBO, P.L.; MATTSSON, J.G.; TOMLEY, F.M.; SHIRLEY, M.W. Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. **Avian Pathology**, v. 27, p.490-497, 1998.
- SCHNITZLER, B.E.; THEBO, P.L.; TOMLEY, F.M.; UGGLA, A.; SHIRLEY, M.W. PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. **Avian Pathology**, v. 28, p.89-93, 1999.
- SHIRLEY, M. W. A reappraisal of the taxonomic status of *Eimeria mivati* Edgar and Seibold 1964, by enzyme electrophoresis and cross-immunity tests. **Parasitology**, v. 78, p. 221 - 237, 1979.

- SHIRLEY, M. W. Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. **Parasitology**, v. 71, p. 369 - 376, 1975.
- SHIRLEY, M.W. Epizootiologia. In: Simpósio Internacional sobre Coccidiose, Santos, SP, FACTA, 1994. **Anais...**, 1994. cap. 3. p.11-22.
- SHIRLEY, M. W., JEFFERS, T. K., LONG, P. L. Studies to determine the taxonomic status of *Eimeria mitis*, Tyzzer 1929 and *E. mivati*, Edgar and Seibold 1964. **Parasitology**, v. 87, p. 185 - 198, 1983.
- TERRA, A.T.; COSTA, P.S. DA; FIGUEIREDO, P.C. DE; CARVALHO, E.C.Q. de. Frequência de espécies do gênero *Eimeria* em frangos de corte abatidos industrialmente no município de Monte Alegre do Sul, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 10(2): 87-90, 2001.
- TSUJI, N.; KAWAZU, S.; OHTA, M.; KAMIO, T.; ISOBE, T.; SHIMURA, K.; FUJISAKI, K. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using two-step Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n.5, p.966-970, 1997.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 7213 - 7218, 1990.
- WILLIAMS, R.B., BUSHELL, A.C., REPERANT, J.M., DOY, T.G., MORGAN, J.H., SHIRLEY, M.W., YVORÉ, P., CARR, M.M., FREMONT, Y. A survey of *Eimeria* species in commercially-reared chickens in France during 1994. **Avian Pathology**, v. 25, p. 113 - 130, 1996.
- WOODS, W.G.; RICHARDS, G.; WHITHEAR, K.G.; ANDERSON, G.R.; JORGENSEN, W.K.; GASSER, R.B. High resolution electrophoretic procedures for the identification of five *Eimeria* species from chickens, and detection of population variation. **Electrophoresis**, v. 21, p. 3558-3563, 2000.
- ZHAO, X.; DUSZYNSKI, D.W.; LOKER, E.S. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p.131-137, 2001.

Apêndice

Reações de PCR

PCR0305.RTF

DATA: 24.02.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Com Óleo Mineral

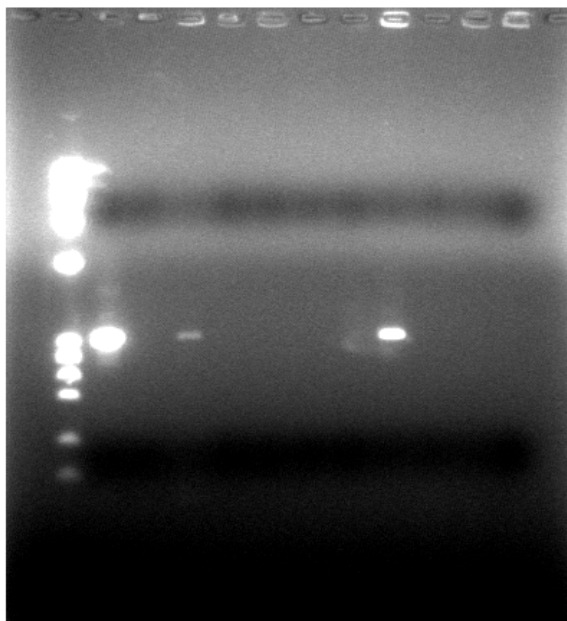
- Programa: Eime1. - Primers: EaF e EaR. - Máquina: Eppendorf 1

Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EaBP2 - 2,80ng	EaF e EaR	+
2	COL1 G1A1 - 2,80 μ L	"	-
3	COL1 G2A1 - 2,80 μ L	"	+
4	COL1 G3A1 - 2,80 μ L	"	-
5	COL1 G4A1 - 2,80 μ L	"	-
6	COL1 G5A1 - 2,80 μ L	"	-
7	COL1 G6A1 - 2,80 μ L	"	-
8	COL1 G7A1 - 2,80 μ L		+
9	COL1 G8A1 - 2,80 μ L		-
10	COL1 G9A1 - 2,80 μ L		-
11	COL1 G10A1 - 2,80 μ L		-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	11	172,7	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	11	27,5	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	11	5,5	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	11	11	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	11	11 μ L /primer (todos 22 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	11	5,5	
Subtotal	22,2 μ L	11	244,2 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

3.Resultados:



PCR0405.RTF

DATA: 28.02.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Com Óleo Mineral- Programa: Eime1. - Primers: EaF e EaR. - Máquina: Eppendorf 1

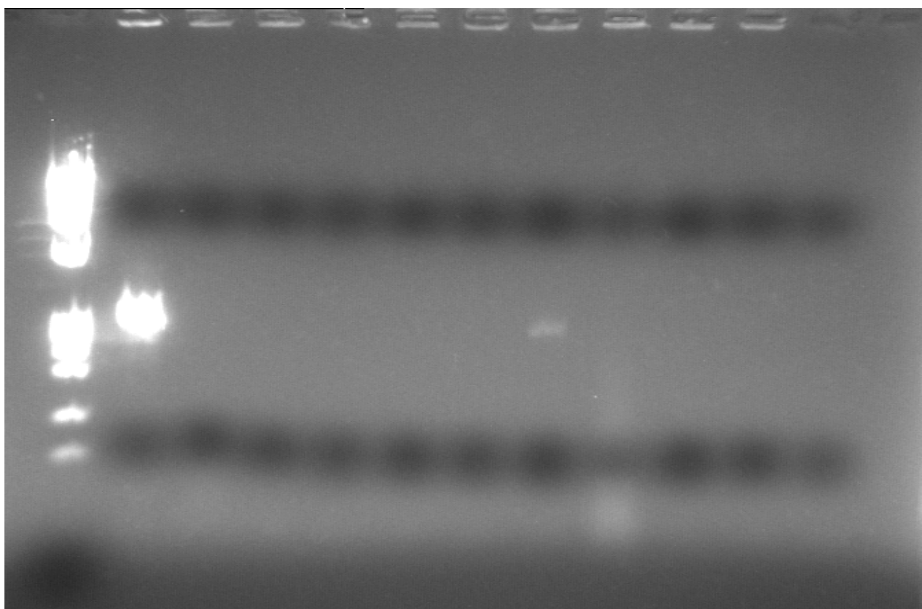
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EaBP2 - 2,80ng	EaF e EaR	+
2	COL1 G1A2 - 2,80µL	"	-
3	COL1 G2A2 - 2,80µL	"	-
4	COL1 G3A2 - 2,80µL	"	-
5	COL1 G4A2 - 2,80µL	"	-
6	COL1 G5A2 - 2,80µL	"	-
7	COL1 G6A2 - 2,80µL	"	+
8	COL1 G7A2 - 2,80µL		-
9	COL1 G8A2 - 2,80µL		+
10	COL1 G9A2 - 2,80µL		-
11	COL1 G10A2 - 2,80µL		-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (µL)	Nº Amostras	Volume Total (µL)	Obs.
H ₂ O	15,7µL	11	172,7	
Tampão da reação 10 X	2,5µL (1 X)	11	27,5	Descongelar bem

dNTPs 10mM* = 10000µM (200X)	0,125µL cada 0,5µL todos (50µM)	11	5,5	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1µL (2mM)	11	11	Descongelar bem
Primers	1,0µL cada 2,0µL todos (10 pmol)	11	11µL /primer (todos 22µL)	
Taq	0,5µL (0,5U)	11	5,5	
Subtotal	22,2µL	11	244,2µL	
DNA Gen	2,8µL			
Vol. total	25µL			

3.Resultados:



PCR0505.RTF

DATA: 01.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Com Óleo Mineral

- Programa: Eime1. - Primers: EaF e EaR. - Máquina: Eppendorf 1

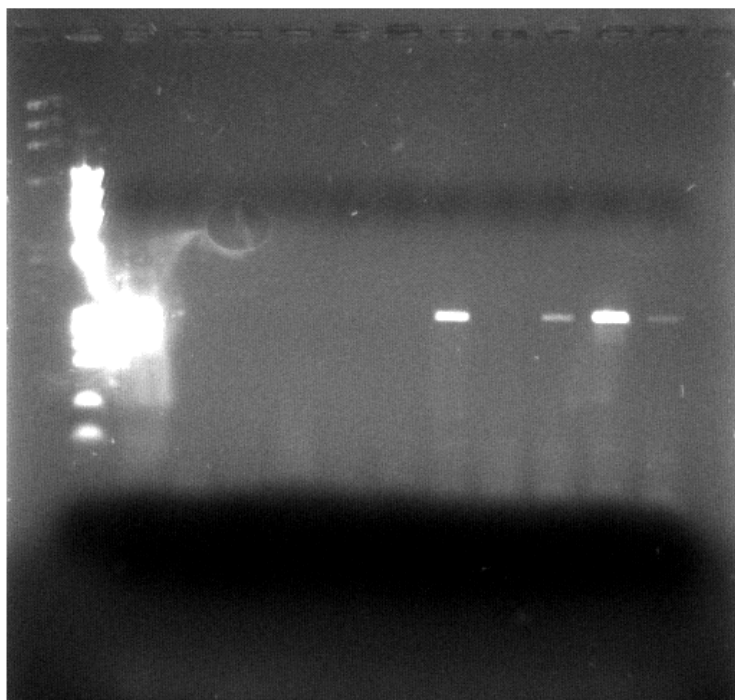
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EaBP2 - 2,80ng	EaF e EaR	+
2	COL1 G1A3 - 2,80µL	"	-
3	COL1 G2A3 - 2,80µL	"	-
4	COL1 G3A3 - 2,80µL	"	-
5	COL1 G4A3 - 2,80µL	"	-
6	COL1 G5A3 - 2,80µL	"	-
7	COL1 G6A3 - 2,80µL		+
8	COL1 G7A3 - 2,80µL		-

9	COL1 G8A3 - 2,80 μ L	“	+
10	COL1 G9A3 - 2,80 μ L		+
11	COL1 G10A3 - 2,80 μ L		+

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	11	172,7	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	11	27,5	Descongelar bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	11	5,5	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	11	11	Descongelar bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	11	11 μ L /primer (todos 22 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	11	5,5	
Subtotal	22,2 μ L	11	244,2 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

5. Resultados:



PCR0605.RTF

DATA: 02.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Com Óleo Mineral

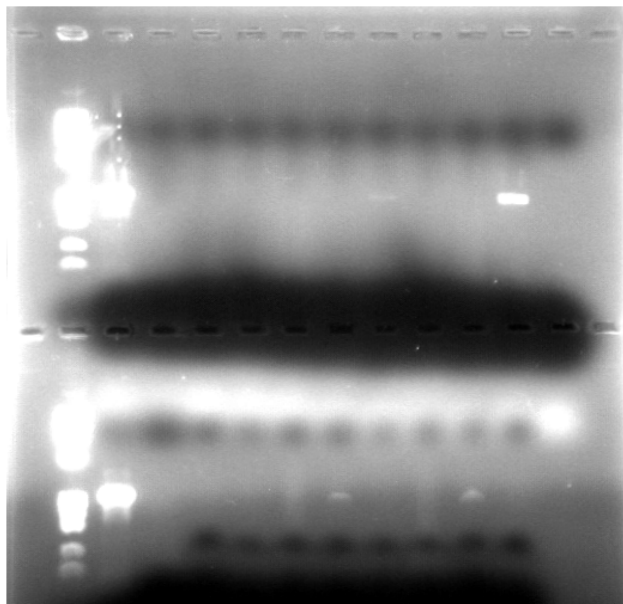
- Programa: Eime1. - Primers: EaF e EaR. - Máquina: Eppendorf 3

Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EaBP2 - 2,80ng	EaF e EaR	+
2	COL2 G1A1 - 2,80 μ L	"	-
3	COL2 G2A1 - 2,80 μ L	"	-
4	COL2 G3A1 - 2,80 μ L	"	-
5	COL2 G4A1 - 2,80 μ L	"	-
6	COL2 G5A1 - 2,80 μ L		-
7	COL2 G6A1 - 2,80 μ L	"	+
8	COL2 G7A1 - 2,80 μ L	"	-
9	COL2 G8A1 - 2,80 μ L	"	-
10	COL2 G9A1 - 2,80 μ L	"	+
11	COL2 G10A1 - 2,80 μ L	"	-
12	COL2 G1A2 - 2,80 μ L	"	-
13	COL2 G2A2 - 2,80 μ L	"	-
14	COL2 G3A2 - 2,80 μ L	"	-
15	COL2 G4A2 - 2,80 μ L	"	-
16	COL2 G5A2 - 2,80 μ L	"	+
17	COL2 G6A2 - 2,80 μ L	"	-
18	COL2 G7A2 - 2,80 μ L	"	-
19	COL2 G8A2 - 2,80 μ L	"	+
20	COL2 G9A2 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	21	329,7**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	21	52,5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	21	10,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	21	21**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	21	21 μ L /primer** (todos 42 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	21	10,5**	
Subtotal	22,2 μ L**	21	466,2 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

3.Resultados



PCR0705.RTF

DATA: 03.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Com Óleo Mineral- Programa: Eime1. - Primers: EaF e EaR. - Máquina: Eppendorf 3

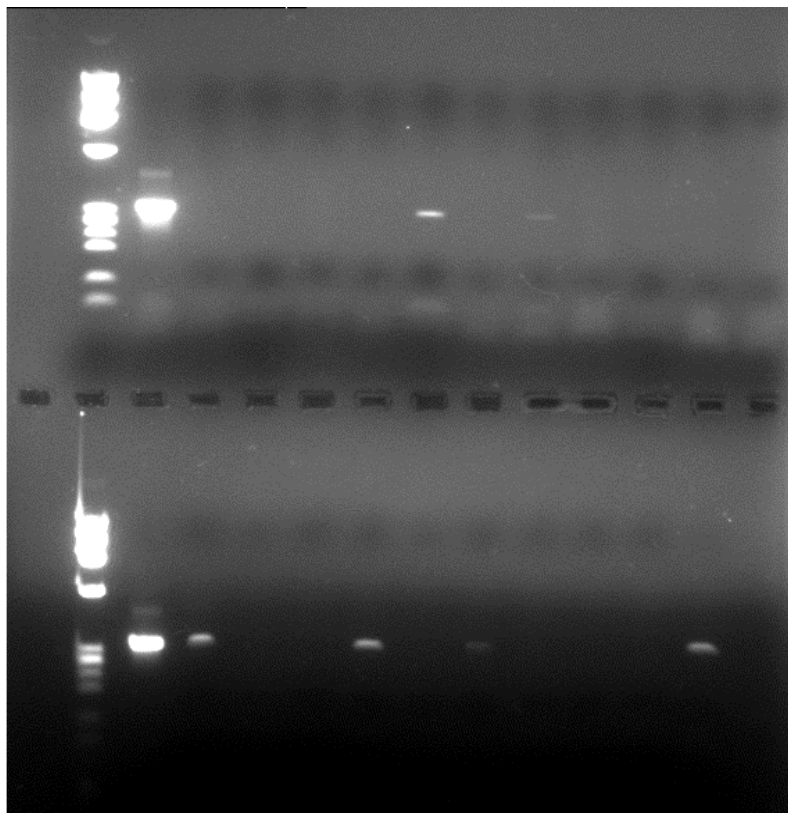
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EaBP2 - 2,80ng	EaF e EaR	+
2	COL2 G10A2 - 2,80 μ L	"	-
3	COL2 G1A3 - 2,80 μ L	"	-
4	COL2 G2A3 - 2,80 μ L	"	-
5	COL2 G3A3 - 2,80 μ L	"	-
6	COL2 G4A3 - 2,80 μ L		+
7	COL2 G5A3 - 2,80 μ L	"	-
8	COL2 G6A3 - 2,80 μ L	"	+
9	COL2 G7A3 - 2,80 μ L	"	-
10	COL2 G8A3 - 2,80 μ L	"	-
11	COL2 G9A3 - 2,80 μ L	"	-
12	COL2 G10A3 - 2,80 μ L	"	-
13	COL3 G1A1 - 2,80 μ L	"	+
14	COL3 G2A1 - 2,80 μ L	"	-
15	COL3 G3A1 - 2,80 μ L	"	-
16	COL3 G4A1 - 2,80 μ L	"	+
17	COL3 G5A1 - 2,80 μ L	"	-
18	COL3 G6A1 - 2,80 μ L	"	+
19	COL3 G7A1 - 2,80 μ L	"	-
20	COL3 G8A1 - 2,80 μ L	"	-

21	COL3 G9A1 - 2,80 μ L	"	-
22	COL3 G10A1 - 2,80 μ L	"	+

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	N ^o Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	22	345,4**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	22	55**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	22	11**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	22	22**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	22	22 μ L /primer** (todos 44 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	22	11**	
Subtotal	22,2 μ L**	22	488,4 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

3. Resultados



PCR0805.RTF

DATA: 04.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Com Óleo Mineral

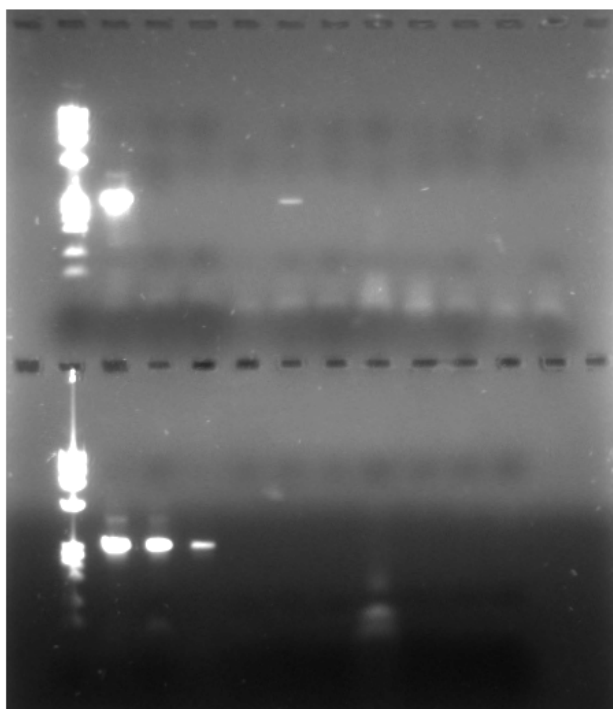
- Programa: Eime1. - Primers: EaF e EaR. - Máquina: Eppendorf 1

Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EaBP2 - 2,80ng	EaF e EaR	+
2	COL3 G1A2 - 2,80 μ L	"	-
3	COL3 G2A2 - 2,80 μ L	"	-
4	COL3 G3A2 - 2,80 μ L	"	-
5	COL3 G4A2 - 2,80 μ L	"	+
6	COL3 G5A2 - 2,80 μ L		-
7	COL3 G6A2 - 2,80 μ L	"	-
8	COL3 G7A2 - 2,80 μ L	"	-
9	COL3 G8A2 - 2,80 μ L	"	-
10	COL3 G9A2 - 2,80 μ L	"	-
11	COL3 G10A2 - 2,80 μ L	"	-
12	COL3 G1A3 - 2,80 μ L	"	+
13	COL3 G2A3 - 2,80 μ L	"	+
14	COL3 G3A3 - 2,80 μ L	"	-
15	COL3 G4A3 - 2,80 μ L	"	-
16	COL3 G5A3 - 2,80 μ L	"	-
17	COL3 G6A3 - 2,80 μ L	"	-
18	COL3 G7A3 - 2,80 μ L	"	-
19	COL3 G8A3 - 2,80 μ L	"	-
20	COL3 G9A3 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	20	314**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	20	50**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	20	10**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	20	20**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	20	20 μ L /primer** (todos 40 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	20	10**	
Subtotal	22,2 μ L**	20	444 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

3. Resultados



PCR0905.RTF

DATA: 05.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EtF e EtR. - Máquina: Eppendorf 1

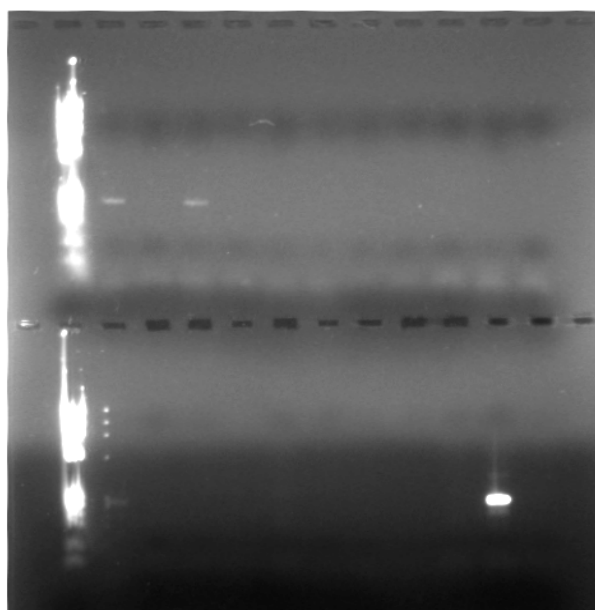
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EtBP - 2,80ng	EtF e EtR	+
2	COL1 G1A1 - 2,80μL	"	-
3	COL1 G2A1 - 2,80μL	"	+
4	COL1 G3A1 - 2,80μL	"	-
5	COL1 G4A1 - 2,80μL	"	-
6	COL1 G5A1 - 2,80μL		-
7	COL1 G6A1 - 2,80μL	"	-
8	COL1 G7A1 - 2,80μL	"	-
9	COL1 G8A1 - 2,80μL	"	-
10	COL1 G9A1 - 2,80μL	"	-
11	COL1 G10A1 - 2,80μL	"	-
12	COL2 G1A1 - 2,80μL	"	-
13	COL2 G2A1 - 2,80μL	"	-
14	COL2 G3A1 - 2,80μL	"	-
15	COL2 G4A1 - 2,80μL	"	-
16	COL2 G5A1 - 2,80μL	"	-

17	COL2 G6A1 - 2,80 μ L	"	-
18	COL2 G7A1 - 2,80 μ L	"	-
19	COL2 G8A1 - 2,80 μ L	"	-
20	COL2 G9A1 - 2,80 μ L	"	+
21	COL2 G10A1 - 2,80 μ L	"	-

2. Cálculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	N ^o Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	21	329,7**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	21	52,5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	21	10,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	21	21**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	21	21 μ L /primer** (todos 42 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	21	10,5**	
Subtotal	22,2 μ L**	21	466,2 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

3. Resultados



PCR1005.RTF

DATA: 07.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EtF e EtR. - Máquina: Eppendorf 1

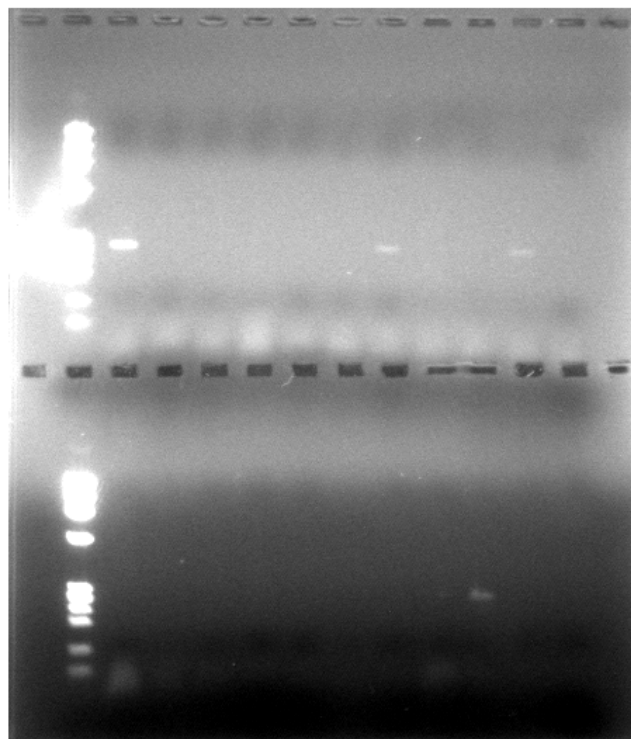
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EtBP - 2,80ng	EtF e EtR	+
2	COL1 G1A3 - 2,80 μ L	"	-
3	COL1 G2A3 - 2,80 μ L	"	-
4	COL1 G3A3 - 2,80 μ L	"	-
5	COL1 G4A3 - 2,80 μ L	"	-
6	COL1 G5A3 - 2,80 μ L		-
7	COL1 G6A3 - 2,80 μ L	"	+
8	COL1 G7A3 - 2,80 μ L	"	-
9	COL1 G8A3 - 2,80 μ L	"	-
10	COL1 G9A3 - 2,80 μ L	"	+
11	COL1 G10A3 - 2,80 μ L	"	-
12	EtBP - 2,80ng		-
13	COL1 G1A2 - 2,80 μ L	"	-
14	COL1 G2A2 - 2,80 μ L	"	-
15	COL1 G3A2 - 2,80 μ L	"	-
16	COL1 G4A2 - 2,80 μ L	"	-
17	COL1 G5A2 - 2,80 μ L	"	-
18	COL1 G6A2 - 2,80 μ L	"	-
19	COL1 G7A2 - 2,80 μ L	"	-
20	COL1 G8A2 - 2,80 μ L	"	+
21	COL1 G9A2 - 2,80 μ L	"	-
22	COL1 G10A2 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	22	345,4**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	22	55**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	22	11**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	22	22**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	22	22 μ L /primer** (todos 44 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	22	11**	
Subtotal	22,2 μ L**	22	488,4 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			

Vol. total	25 μ L			
------------	------------	--	--	--

4. Resultados



PCR1105.RTF

DATA: 08.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EtF e EtR. - Máquina: Eppendorf 1

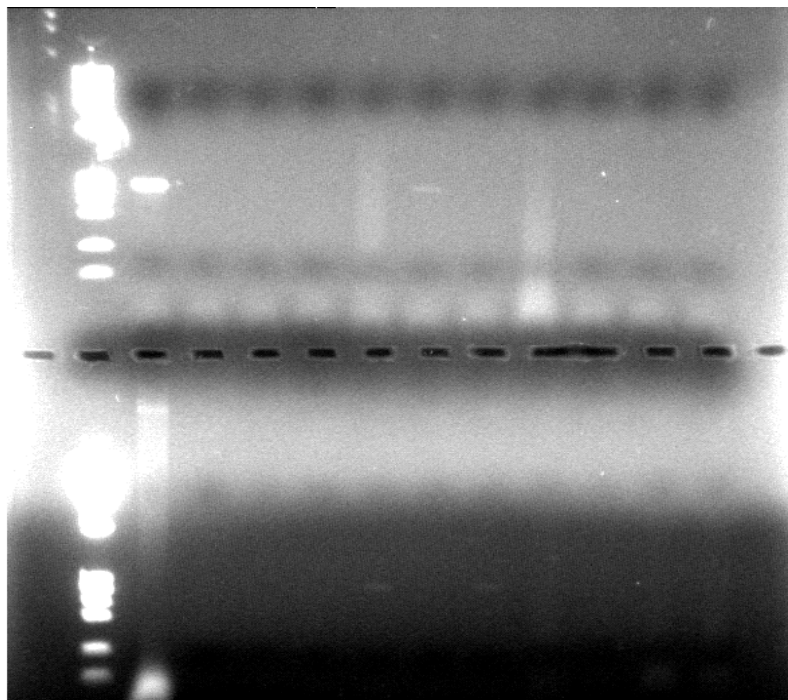
	Amostras:	Primers:	Obs.:
1	EtBP - 2,80ng	EtF e EtR	+
2	COL2 G1A2 - 2,80 μ L	"	-
3	COL2 G2A2 - 2,80 μ L	"	-
4	COL2 G3A2 - 2,80 μ L	"	-
5	COL2 G4A2 - 2,80 μ L	"	-
6	COL2 G5A2 - 2,80 μ L	"	+
7	COL2 G6A2 - 2,80 μ L	"	-
8	COL2 G7A2 - 2,80 μ L	"	-
9	COL2 G8A2 - 2,80 μ L	"	-
10	COL2 G9A2 - 2,80 μ L	"	-
11	COL2 G10A2 - 2,80 μ L	"	-
12	EtBP - 2,80ng		-
13	COL2 G1A3 - 2,80 μ L	"	-
14	COL2 G2A3 - 2,80 μ L	"	-

15	COL2 G3A3 - 2,80 μ L	"	-
16	COL2 G4A3 - 2,80 μ L	"	+
17	COL2 G5A3 - 2,80 μ L	"	-
18	COL2 G6A3 - 2,80 μ L	"	+
19	COL2 G7A3 - 2,80 μ L	"	-
20	COL2 G8A3 - 2,80 μ L	"	-
21	COL2 G9A3 - 2,80 μ L	"	-
22	COL2 G10A3 - 2,80 μ L	"	-

2. Cálculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	23	361,1**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	23	57,5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	23	11,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	23	23**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	23	23 μ L /primer** (todos 46 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	23	11,5**	
Subtotal	22,2 μ L**	23	510,6 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

4. Resultados:



PCR1205.RTF

DATA: 09.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

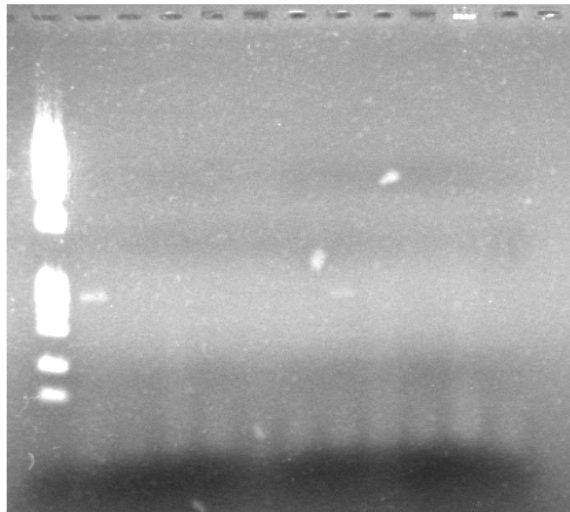
- Programa: Eime1. - Primers: EtF e EtR. - Máquina: Eppendorf 1

Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EtBP - 2,80ng	EtF e EtR	+
2	COL3 G1A1 - 2,80µL	"	-
3	COL3 G2A1 - 2,80µL	"	-
4	COL3 G3A1 - 2,80µL	"	-
5	COL3 G4A1 - 2,80µL	"	-
6	COL3 G5A1 - 2,80µL	"	-
7	COL3 G6A1 - 2,80µL	"	+
8	COL3 G7A1 - 2,80µL	"	-
9	COL3 G8A1 - 2,80µL	"	-
10	COL3 G9A1 - 2,80µL	"	-
11	COL3 G10A1 - 2,80µL	"	-
12	COL3 G1A2 - 2,80µL	"	-
13	COL3 G2A2 - 2,80µL	"	-
14	COL3 G3A2 - 2,80µL	"	-
15	COL3 G4A2 - 2,80µL	"	-
16	COL3 G5A2 - 2,80µL	"	-
17	COL3 G6A2 - 2,80µL	"	-
18	COL3 G7A2 - 2,80µL	"	-
19	COL3 G8A2 - 2,80µL	"	-
20	COL3 G9A2 - 2,80µL	"	-
21	COL3 G10A2 - 2,80µL	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (µL)	Nº Amostras	Volume Total (µL)	Obs.
H ₂ O	15,7µL	22	345,4**	
Tampão da reação 10 X	2,5µL (1 X)	22	55**	Descongelar bem
dNTPs 10mM* = 10000µM (200X)	0,125µL cada 0,5µL todos (50µM)	22	11**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1µL (2mM)	22	22**	Descongelar bem
Primers	1,0µL cada 2,0µL todos (10 pmol)	22	22µL /primer** (todos 44µL)	
Taq	0,5µL (0,5U)	22	11**	
Subtotal	22,2µL **	22	488,4µL	
DNA Gen	2,8µL			
Vol. total	25µL			

4. Resultados



PCR1305.RTF

DATA: 10.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EtF e EtR e EmaF e EmaR. - Máquina: Eppendorf 1

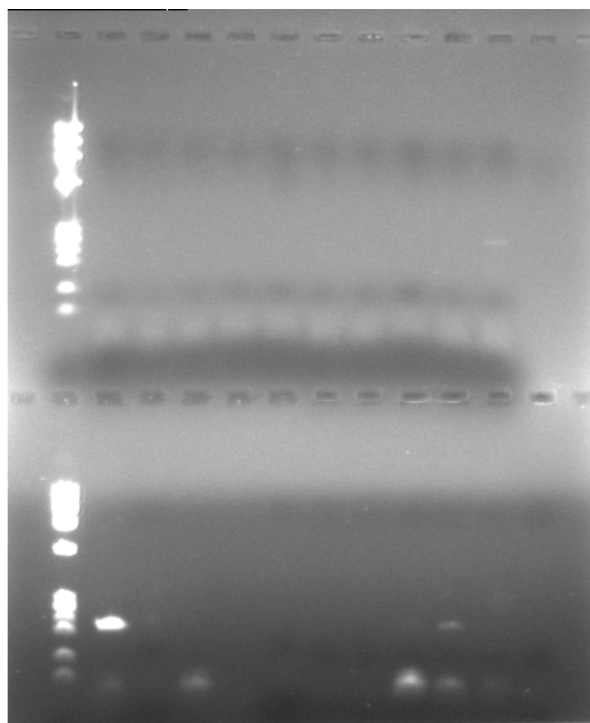
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EtBP - 2,80ng	EtF e EtR	-
2	COL3 G1A3 - 2,80µL	"	-
3	COL3 G2A3 - 2,80µL	"	-
4	COL3 G3A3 - 2,80µL	"	-
5	COL3 G4A3 - 2,80µL	"	-
6	COL3 G5A3 - 2,80µL	"	-
7	COL3 G6A3 - 2,80µL	"	-
8	COL3 G7A3 - 2,80µL	"	-
9	COL3 G8A3 - 2,80µL	"	-
10	COL3 G9A3 - 2,80µL	"	+
11	Ema - 2,80ng	EmaF e EmaR	+
12	COL1 G1A1 - 2,80µL	"	-
13	COL1 G2A1 - 2,80µL	"	-
14	COL1 G3A1 - 2,80µL	"	-
15	COL1 G4A1 - 2,80µL	"	-
16	COL1 G5A1 - 2,80µL	"	-
17	COL1 G6A1 - 2,80µL	"	-
18	COL1 G7A1 - 2,80µL	"	-
19	COL1 G8A1 - 2,80µL	"	+

20	COL1 G9A1 - 2,80 μ L	"	-
21	COL1 G10A1 - 2,80 μ L	"	-

2. Cálculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	12	188,4**x2	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	12	30**x2	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	12	6**x2	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	12	12**x2	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	12	12 μ L /primer**x2 (todos 24 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	12	6**x2	
Subtotal	22,2 μ L**	12	266,4 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

4. Resultados:



PCR1405.RTF

DATA: 11.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EmaF e EmaR. - Máquina: Eppendorf 1

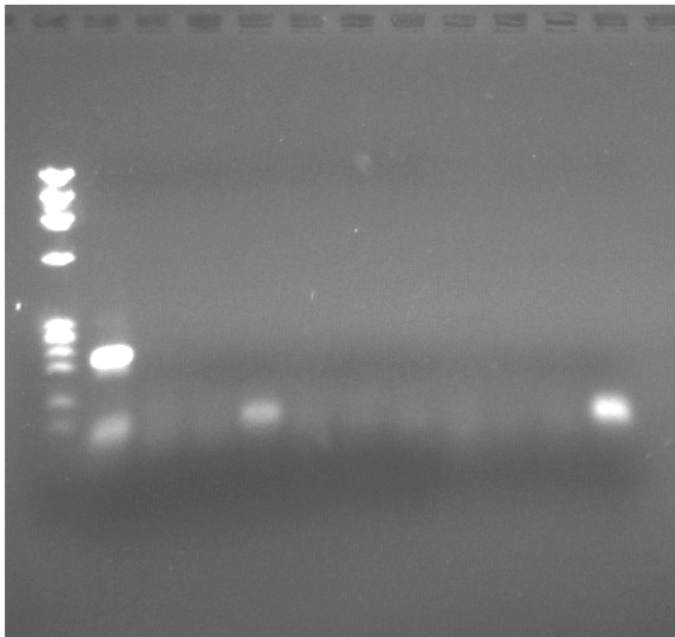
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	Ema - 2,80ng	EmaF e EmaR	+
2	COL1 G1A2 - 2,80 μ L	"	-
3	COL1 G2A2 - 2,80 μ L	"	-
4	COL1 G3A2 - 2,80 μ L	"	-
5	COL1 G4A2 - 2,80 μ L	"	-
6	COL1 G5A2 - 2,80 μ L	"	-
7	COL1 G6A2 - 2,80 μ L	"	-
8	COL1 G7A2 - 2,80 μ L	"	-
9	COL1 G8A2 - 2,80 μ L	"	-
10	COL1 G9A2 - 2,80 μ L	"	-
11	COL1 G10A2 - 2,80 μ L	"	-
12	Ema - 2,80ng	"	+
13	COL1 G1A3 - 2,80 μ L	"	-
14	COL1 G2A3 - 2,80 μ L	"	-
15	COL1 G3A3 - 2,80 μ L	"	-
16	COL1 G4A3 - 2,80 μ L	"	-
17	COL1 G5A3 - 2,80 μ L	"	-
18	COL1 G6A3 - 2,80 μ L	"	-
19	COL1 G7A3 - 2,80 μ L	"	-
20	COL1 G8A3 - 2,80 μ L	"	+
21	COL1 G9A3 - 2,80 μ L	"	+
22	COL1 G10A3 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	23	361,1**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	23	57,5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	23	11,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e alíquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	23	23**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	23	23 μ L /primer** (todos 46 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	23	11,5**	
Subtotal	22,2 μ L**	23	510,6 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			

Vol. total	25 μ L			
------------	------------	--	--	--

4. Resultados:



PCR1505.RTF

DATA: 12.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EmaF e EmaR. - Máquina: Eppendorf 1

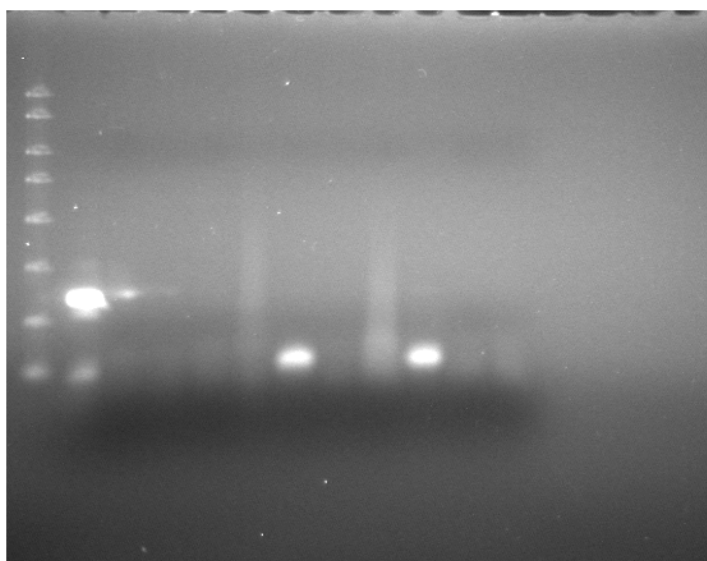
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	Ema - 2,80ng	EmaF e EmaR	+
2	COL2 G1A1 - 2,80 μ L	"	-
3	COL2 G2A1 - 2,80 μ L	"	-
4	COL2 G3A1 - 2,80 μ L	"	-
5	COL2 G4A1 - 2,80 μ L	"	-
6	COL2 G5A1 - 2,80 μ L	"	-
7	COL2 G6A1 - 2,80 μ L	"	-
8	COL2 G7A1 - 2,80 μ L	"	-
9	COL2 G8A1 - 2,80 μ L	"	-
10	COL2 G9A1 - 2,80 μ L	"	+
11	COL2 G10A1 - 2,80 μ L	"	+
12	Ema - 2,80ng	"	+
13	COL2 G1A2 - 2,80 μ L	"	+
14	COL2 G2A2 - 2,80 μ L	"	+

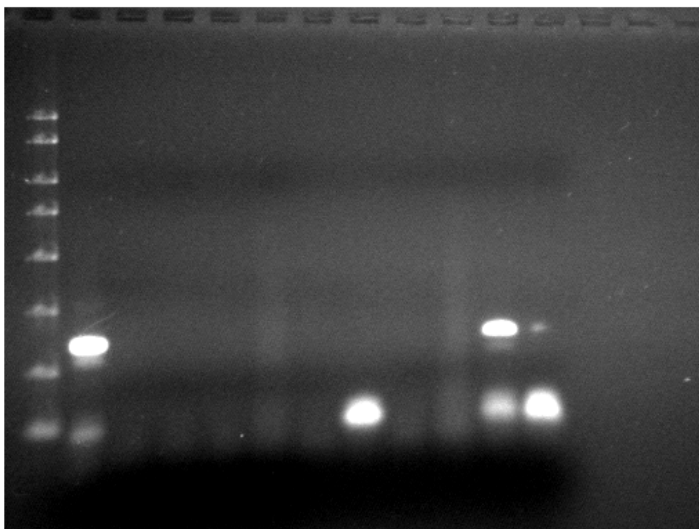
15	COL2 G3A2 - 2,80 μ L	"	-
16	COL2 G4A2 - 2,80 μ L	"	-
17	COL2 G5A2 - 2,80 μ L	"	-
18	COL2 G6A2 - 2,80 μ L	"	-
19	COL2 G7A2 - 2,80 μ L	"	-
20	COL2 G8A2 - 2,80 μ L	"	-
21	COL2 G9A2 - 2,80 μ L	"	-
22	COL2 G10A2 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	23	361,1**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	23	57,5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	23	11,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	23	23**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	23	23 μ L /primer** (todos 46 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	23	11,5**	
Subtotal	22,2 μ L**	23	510,6 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

4. Resultados





PCR1605.RTF

DATA: 12.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EmaF e EmaR. - Máquina: Eppendorf 3

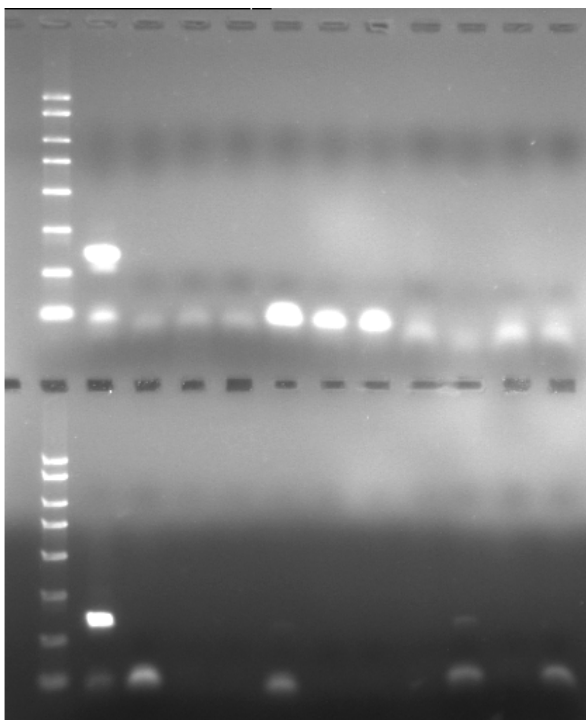
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	Ema - 2,80ng	EmaF e EmaR	+
2	COL2 G1A3 - 2,80µL	"	-
3	COL2 G2A3 - 2,80µL	"	-
4	COL2 G3A3 - 2,80µL	"	-
5	COL2 G4A3 - 2,80µL	"	-
6	COL2 G5A3 - 2,80µL	"	-
7	COL2 G6A3 - 2,80µL	"	-
8	COL2 G7A3 - 2,80µL	"	-
9	COL2 G8A3 - 2,80µL	"	-
10	COL2 G9A3 - 2,80µL	"	-
11	COL2 G10A3 - 2,80µL	"	-
12	Ema - 2,80ng	"	+
13	COL3 G1A1 - 2,80µL	"	-
14	COL3 G2A1 - 2,80µL	"	-
15	COL3 G3A1 - 2,80µL	"	-
16	COL3 G4A1 - 2,80µL	"	-
17	COL3 G5A1 - 2,80µL	"	-
18	COL3 G6A1 - 2,80µL	"	-
19	COL3 G7A1 - 2,80µL	"	-

20	COL3 G8A1 - 2,80 μ L	"	+
21	COL3 G9A1 - 2,80 μ L	"	-
22	COL3 G10A1 - 2,80 μ L	"	-

2. Cálculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	23	361,1**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	23	57,5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	23	11,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e alíquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	23	23**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	23	23 μ L /primer** (todos 46 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	23	11,5**	
Subtotal	22,2 μ L**	23	510,6 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

4. Resultados



PCR1705.RTF

DATA: 14.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

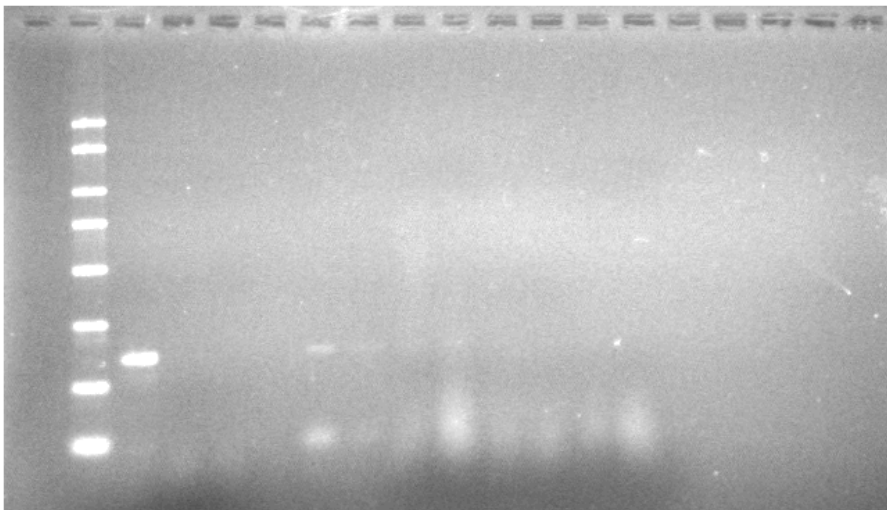
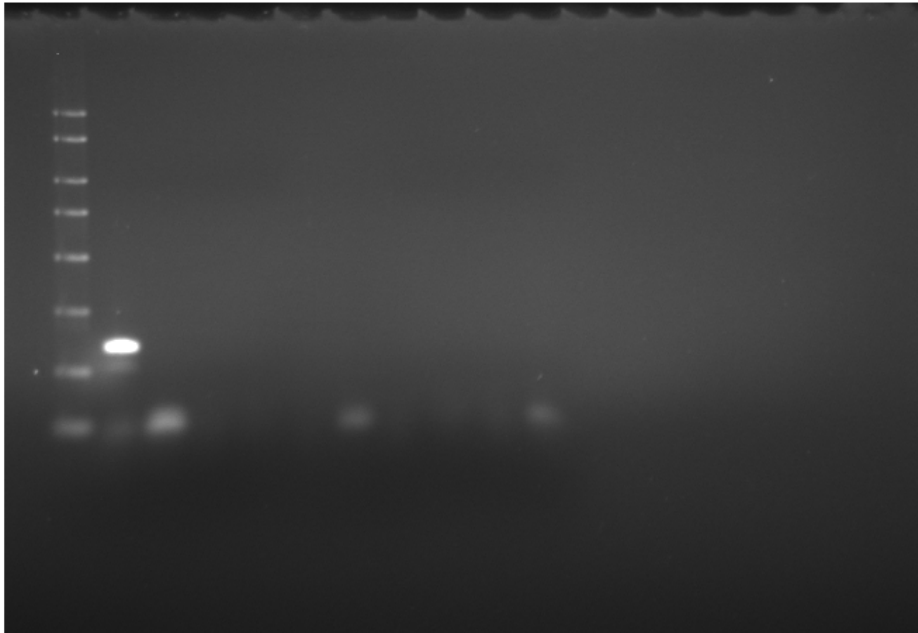
- Programa: Eime1. - Primers: EmaF e EmaR. - Máquina: Eppendorf 1

Amostras:		Primers:	Obs.:
1	Ema - 2,80ng	EmaF e EmaR	+
2	COL3 G1A2 - 2,80µL	"	-
3	COL3 G2A2 - 2,80µL	"	-
4	COL3 G3A2 - 2,80µL	"	-
5	COL3 G4A2 - 2,80µL	"	+
6	COL3 G5A2 - 2,80µL	"	-
7	COL3 G6A2 - 2,80µL	"	-
8	COL3 G7A2 - 2,80µL	"	-
9	COL3 G8A2 - 2,80µL	"	-
10	COL3 G9A2 - 2,80µL	"	-
11	COL3 G10A2 - 2,80µL	"	-
12	Ema - 2,80ng	"	+
13	COL3 G1A3 - 2,80µL	"	-
14	COL3 G2A3 - 2,80µL	"	-
15	COL3 G3A3 - 2,80µL	"	-
16	COL3 G4A3 - 2,80µL	"	-
17	COL3 G5A3 - 2,80µL	"	-
18	COL3 G6A3 - 2,80µL	"	-
19	COL3 G7A3 - 2,80µL	"	-
20	COL3 G8A3 - 2,80µL	"	-
21	COL3 G9A3 - 2,80µL	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (µL)	Nº Amostras	Volume Total (µL)	Obs.
H ₂ O	15,7µL	23	361,1**	
Tampão da reação 10 X	2,5µL (1 X)	23	57,5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000µM (200X)	0,125µL cada 0,5µL todos (50µM)	23	11,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e alíquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1µL (2mM)	23	23**	Descongela bem
Primers	1,0µL cada 2,0µL todos (10 pmol)	23	23µL /primer** (todos 46µL)	
Taq	0,5µL (0,5U)	23	11,5**	
Subtotal	22,2µL **	23	510,6µL	
DNA Gen	2,8µL			
Vol. total	25µL			

4. Resultados:



PCR1805.RTF

DATA: 14.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EmiF e EmiR. - Máquina: Eppendorf 3

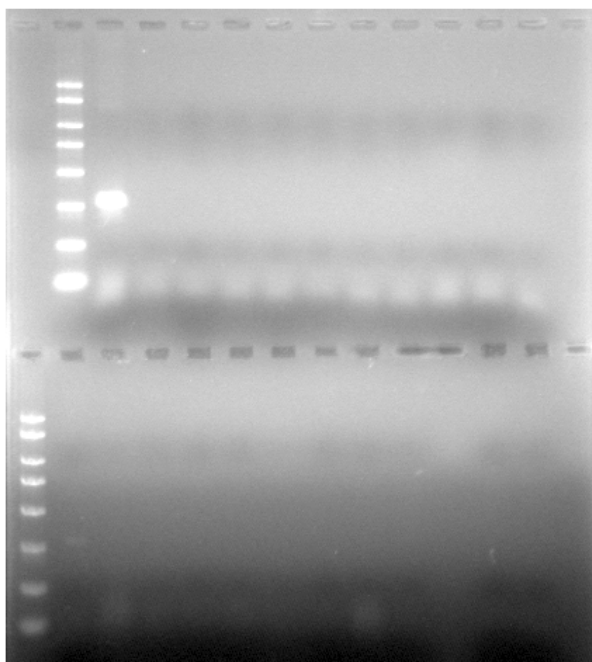
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EmiBP - 2,80ng	EmiF e EmiR	+
2	COL1 G1A1 - 2,80 μ L	"	-
3	COL1 G2A1 - 2,80 μ L	"	-
4	COL1 G3A1 - 2,80 μ L	"	-
5	COL1 G4A1 - 2,80 μ L	"	-
6	COL1 G5A1 - 2,80 μ L	"	-
7	COL1 G6A1 - 2,80 μ L	"	-
8	COL1 G7A1 - 2,80 μ L	"	-
9	COL1 G8A1 - 2,80 μ L	"	-
10	COL1 G9A1 - 2,80 μ L	"	-
11	COL1 G10A1 - 2,80 μ L	"	-
12	EmiL1 - 2,80ng	"	+
13	COL1 G1A2 - 2,80 μ L	"	-
14	COL1 G2A2 - 2,80 μ L	"	-
15	COL1 G3A2 - 2,80 μ L	"	-
16	COL1 G4A2 - 2,80 μ L	"	-
17	COL1 G5A2 - 2,80 μ L	"	-
18	COL1 G6A2 - 2,80 μ L	"	-
19	COL1 G7A2 - 2,80 μ L	"	-
20	COL1 G8A2 - 2,80 μ L	"	-
21	COL1 G9A2 - 2,80 μ L	"	-
22	COL1 G10A2 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	23	361,1**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	23	57,5**	Descongelar bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	23	11,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	23	23**	Descongelar bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	23	23 μ L /primer** (todos 46 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	23	11,5**	
Subtotal	22,2 μ L **	23	510,6 μ L	

DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

4. Resultados:



PCR1905.RTF

DATA: 15.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EmiF e EmiR. - Máquina: Eppendorf 1

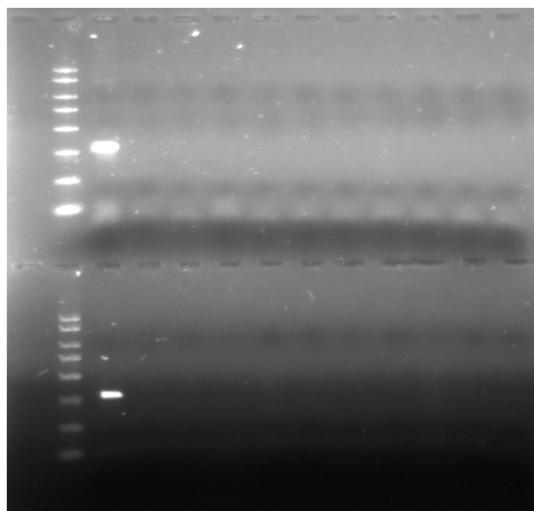
Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EmiBP - 2,80ng	EmiF e EmiR	+
2	COL1 G1A3 - 2,80 μ L	"	-
3	COL1 G2A3 - 2,80 μ L	"	-
4	COL1 G3A3 - 2,80 μ L	"	-
5	COL1 G4A3 - 2,80 μ L	"	-
6	COL1 G5A3 - 2,80 μ L	"	-
7	COL1 G6A3 - 2,80 μ L	"	-
8	COL1 G7A3 - 2,80 μ L	"	-
9	COL1 G8A3 - 2,80 μ L	"	-
10	COL1 G9A3 - 2,80 μ L	"	-
11	COL1 G10A3 - 2,80 μ L	"	-

12	EmiL5 - 2,80ng	"	+
13	COL2 G1A1 - 2,80 μ L	"	-
14	COL2 G2A1 - 2,80 μ L	"	-
15	COL2 G3A1 - 2,80 μ L	"	-
16	COL2 G4A1 - 2,80 μ L	"	-
17	COL2 G5A1 - 2,80 μ L	"	-
18	COL2 G6A1 - 2,80 μ L	"	-
19	COL2 G7A1 - 2,80 μ L	"	-
20	COL2 G8A1 - 2,80 μ L	"	-
21	COL2 G9A1 - 2,80 μ L	"	-
22	COL2 G10A1 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	N ^o Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	23	361,1**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	23	57,5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	23	11,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	23	23**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	23	23 μ L /primer** (todos 46 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	23	11,5**	
Subtotal	22,2 μ L**	23	510,6 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

4. Resultados



PCR2005.RTF

DATA: 15.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EmiF e EmiR. - Máquina: Eppendorf 1

Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EmiBP - 2,80ng	EmiF e EmiR	+
2	COL2 G1A2 - 2,80µL	"	-
3	COL2 G2A2 - 2,80µL	"	-
4	COL2 G3A2 - 2,80µL	"	-
5	COL2 G4A2 - 2,80µL	"	-
6	COL2 G5A2 - 2,80µL	"	-
7	COL2 G6A2 - 2,80µL	"	-
8	COL2 G7A2 - 2,80µL	"	-
9	COL2 G8A2 - 2,80µL	"	-
10	COL2 G9A2 - 2,80µL	"	-
11	COL2 G10A2 - 2,80µL	"	-
12	EmiL1 - 2,80ng	"	+
13	COL2 G1A3 - 2,80µL	"	-
14	COL2 G2A3 - 2,80µL	"	-
15	COL2 G3A3 - 2,80µL	"	-
16	COL2 G4A3 - 2,80µL	"	-
17	COL2 G5A3 - 2,80µL	"	-
18	COL2 G6A3 - 2,80µL	"	-
19	COL2 G7A3 - 2,80µL	"	-
20	COL2 G8A3 - 2,80µL	"	-
21	COL2 G9A3 - 2,80µL	"	-
22	COL2 G10A3 - 2,80µL	"	-

2. Calculo do mix da reação:

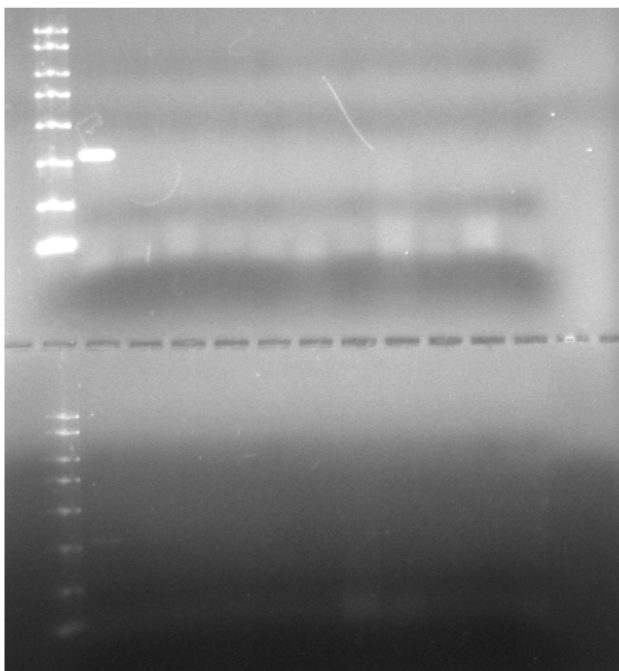
Ingredientes	Volume/amostra (µL)	Nº Amostras	Volume Total (µL)	Obs.
H ₂ O	15,7µL	23	361,1**	
Tampão da reação 10 X	2,5µL (1 X)	23	57,5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000µM (200X)	0,125µL cada 0,5µL todos (50µM)	23	11,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1µL (2mM)	23	23**	Descongela bem
Primers	1,0µL cada 2,0µL todos (10 pmol)	23	23µL /primer** (todos 46µL)	
Taq	0,5µL (0,5U)	23	11,5**	
Subtotal	22,2µL **	23	510,6µL	
DNA Gen	2,8µL			

20	COL3 G8A3 - 2,80 μ L	"	-
21	COL3 G9A3 - 2,80 μ L	"	-
22	COL3 G10A3 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	N ^o Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	23	361,1**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	23	57,5**	Descongelar bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	23	11,5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	23	23**	Descongelar bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	23	23 μ L /primer** (todos 46 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	23	11,5**	
Subtotal	22,2 μ L**	23	510,6 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

4. Resultados



PCR2205.RTF

DATA: 22.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

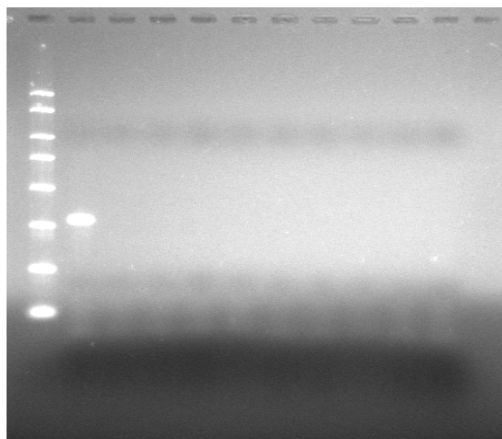
- Programa: Eime1. - Primers: EmiF e EmiR. - Máquina: Eppendorf 1

Amostras:		Primers:	Obs.:
1	E miL5 - 2,80ng	EmiF e EmiR	+
2	COL3 G1A3 - 2,80 μ L	"	-
3	COL3 G2A3 - 2,80 μ L	"	-
4	COL3 G3A3 - 2,80 μ L	"	-
5	COL3 G4A3 - 2,80 μ L	"	-
6	COL3 G5A3 - 2,80 μ L	"	-
7	COL3 G6A3 - 2,80 μ L	"	-
8	COL3 G7A3 - 2,80 μ L	"	-
9	COL3 G8A3 - 2,80 μ L	"	-
10	COL3 G9A3 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	11	172.7**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	11	27.5**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	11	5.5**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	11	11**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	11	11 μ L /primer** (todos 22 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	11	5.5**	
Subtotal	22,2 μ L **		244.2 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

4. Resultados



PCR2305.RTF

DATA: 23.03.2005

1. Programação da reação: - Taq Polimerase: Taq DNA polimerase Biotools.

- Programa: Eime1. - Primers: EaF e EaR /EtF e EtR/EmaF e EmaR/EmiF e EmiR

Máquina: Eppendorf 1

Amostras:		Primers:	Obs.:
1	EaL8a - 2,80ng	EaF e EaR	+
2	COL3 G10A3 - 2,80 μ L	"	-
3	COL4 G1A1 - 2,80 μ L	"	-
4	COL4 G2A1 - 2,80 μ L	"	-
5	COL4 G4A1 - 2,80 μ L	"	+
6	EtBP - 2,80ng	EtF e EtR	-
7	COL3 G10A3 - 2,80 μ L	"	-
8	COL4 G1A1 - 2,80 μ L	"	-
9	COL4 G2A1 - 2,80 μ L	"	-
10	COL4 G4A1 - 2,80 μ L	"	-
11	EmaBP - 2,80ng	EmaF e EmaR	+
12	COL3 G10A3 - 2,80 μ L		-
13	COL4 G1A1 - 2,80 μ L		+
14	COL4 G2A1 - 2,80 μ L	"	-
15	COL4 G4A1 - 2,80 μ L	"	-
16	EmiL5 - 2,80ng	EmiF e EmiR	+
17	COL3 G10A3 - 2,80 μ L	"	-
18	COL4 G1A1 - 2,80 μ L	"	-
19	COL4 G2A1 - 2,80 μ L	"	-
20	COL4 G4A1 - 2,80 μ L	"	-

2. Calculo do mix da reação:

Ingredientes	Volume/amostra (μ L)	Nº Amostras	Volume Total (μ L)	Obs.
H ₂ O	15,7 μ L	06	94.2**	
Tampão da reação 10 X	2,5 μ L (1 X)	06	15**	Descongela bem
dNTPs 10mM* = 10000 μ M (200X)	0,125 μ L cada 0,5 μ L todos (50 μ M)	06	3**	Juntar todos dNTPs, diluir 1:10 em água e aliquotar*
MgCl ₂ 50mM (25X)	1 μ L (2mM)	06	6**	Descongela bem
Primers	1,0 μ L cada 2,0 μ L todos (10 pmol)	06	6 μ L /primer** (todos 12 μ L)	
Taq	0,5 μ L (0,5U)	06	3**	
Subtotal	22,2 μ L**	06	133.2 μ L	
DNA Gen	2,8 μ L			
Vol. total	25 μ L			

4. Resultados:

